

Raman-Spektroskopie in Biomedizin und an nahfeldgekoppelten Nanosystemen

Dissertation

Elina Oberlander

Biomolekulare Photonik
Fakultät für Physik
Universität Bielefeld

Betreut durch

Prof. Dr. T. Huser

Bielefeld, 13.06.2016

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
2	<i>Theoretische Grundlagen</i>	5
2.1	Historisches	5
2.2	Licht-Materie-Wechselwirkung	7
2.2.1	Atom-Licht-Wechselwirkung	7
2.2.2	Molekül-Licht-Wechselwirkung	8
2.2.3	Fluoreszenz als Störmechanismus in der spontanen Raman-Spektroskopie	14
2.3	Der harmonische Oszillator als Modell für die Schwingung eines zweiatomigen Moleküls	25
2.4	Beschreibung der Raman-Streuung mit Hilfe der Polarisierbarkeit eines Moleküls	30
3	<i>Experimentelle und mathematische Methoden</i>	33
3.1	Optomechanischer Aufbau zur spontanen Raman-Spektroskopie	33
3.2	Möglichkeiten multispektraler Analyse	53
3.3	Unterschiede zwischen verschiedenen Trägermaterialien für die spontane Raman-Spektroskopie	56
3.4	Mathematische Methoden der Datendarstellung	61
3.4.1	Lieber-Algorithmus zum Hintergrundabzug	61
3.4.2	Hauptkomponentenanalyse zur Reduktion und Klassifizierung mehrdimensionaler Datensätze	63
4	<i>Ergebnisse</i>	67
4.1	Identifizierung von Atherosklerose-Markern in humanen Aorta-Gewebeschnitten	68
4.1.1	Motivation	68
4.1.2	Aufbau von Arterien und Entstehungsmechanismus der Atherosklerose	70
4.1.3	Etablierte Diagnostikmethoden zur Charakterisierung von atherosklerotischen Plaques	74
4.1.4	Probenpräparation	82
4.1.5	Probencharakterisierung mit Lichtmikroskopie und histologischer Färbung	83
4.1.6	Gewebecharakterisierung mittels Raman-Spektroskopie	86
4.1.7	Zusammenfassung und Ausblick	98
4.2	Untersuchung der Zusammensetzung von lipidreichen Kompartimenten in Mikroalgen	100
4.2.1	Motivation	100
4.2.2	Lipidakkumulation in <i>Monoraphidium neglectum</i>	102
4.2.3	Probenpräparation	110

4.2.4	Probencharakterisierung	112
4.2.5	Spontane Raman-Spektroskopie an einzelnen Mikroalgen	116
4.2.6	Zusammenfassung und Ausblick	124
4.3	Verstärkung des Raman-Signals von Nanofilmen in einer optischen Nanokavität	126
4.3.1	Motivation	126
4.3.2	Geometrie der Nanokavität	130
4.3.3	Proof-of-Principle der Signalverstärkung in der Nanokavität	136
4.3.4	Anwendung der Nanokavität für die Untersuchung von Raman-aktiven dünnen Schichten	139
4.3.5	Zusammenfassung und Ausblick	147
4.4	Wellenlängenabhängigkeit der oberflächenverstärkten Raman-Streuung an Nanopartikel-Dimeren	149
4.4.1	Motivation	149
4.4.2	SERS-Grundlagen und Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors	152
4.4.3	Probenpräparation und Charakterisierung	160
4.4.4	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie	168
4.4.5	Simulation der Absorptionsspektren und Nahfeldverteilungen im resonanten und nicht-resonanten Fall	172
4.4.6	Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors für Dimere	178
4.4.7	Zusammenfassung und Ausblick	182
5	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	<i>184</i>
6	<i>Danksagung</i>	<i>188</i>
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>189</i>

Abkürzungsverzeichnis

AFM	engl. Atomic Force Microscopy
AOTF	engl. Acousto-Optical Tunable Filter
ArKr	Argon-Krypton-Laser
BK7	Borosilikat-Glas
BP	Bandpassfilter
CaF ₂	Calciumfluorid
CARS	engl. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DST	Dichroitischer Strahlteiler
EF	engl. Enhancement Factor
FDTD	engl. Finite Difference Time Domain
FPR	Fabry-Pérot-Resonator
GM	Galvanometrische Scan-Spiegel
HDL	engl. High Density Lipid
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HeNe	Helium-Neon-Laser
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
LD	engl. Lipid Droplet
LDL	engl. Low Density Lipid
LP	Langpassfilter
MALDI-TOF	engl. Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight
MgF ₂	Magnesiumfluorid
NA	Numerische Apertur
NIR	Nahes Infrarot
NP	Nanopartikel
OCT	engl. Optical Coherence Tomography
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	engl. Principal Component

PCA	engl. Principal Component Analysis
PMT	Photomultiplier
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
RNA	Riboxynukleinsäure
SAM	engl. Self-Assembled Monolayer
SERDS	engl. Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy
SERS	engl. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
SHG	engl. Second Harmonic Generation
SP	engl. Surface Plasmon
SRS	engl. Stimulated Raman Scattering
ST	Strahlteiler
TAG	Triacylglycerid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TERS	engl. Tip-Enhanced Raman Spectroscopy
UV	Ultraviolett-Strahlung
VIS	engl. Visible Light
VLDL	engl. Very Low Density Lipid
WMRS	engl. Wavelength-Modulated Raman Spectroscopy

1 Einleitung

Die Strukturaufklärung legt den Grundstein für die Charakterisierung intermolekularer Prozesse und die damit verbundene Entwicklung neuer Lösungsstrategien bei verschiedensten Fragenstellungen, ob es sich um zytologische und histologische Diagnostik [1], Qualitätskontrollen in der Festplattenindustrie [2] und Pharmazie [3] oder Echtheit von Kunstgegenständen [4] handelt. Daher sind Methoden zur Strukturbestimmung wichtige Werkzeuge zur Identifizierung von unbekanntem und zum Nachweis von bekannten Verbindungen. Gegenwärtig existiert eine Vielzahl verschiedener Verfahren zur Strukturaufklärung, z. B. Massenspektroskopie, magnetische Kernspinresonanz oder optische Vibrationspektroskopie. Diese unterscheiden sich in ihren Eigenschaften, wie Aussagekraft der Messdaten, Sensitivität, Probenpräparation und Anforderungen an die Probe [5].

Eine der wichtigsten Charakterisierungsmethoden ist jedoch die Raman-Spektroskopie, benannt nach ihrem Entdecker C. V. Raman, welcher dafür 1930 mit dem Nobelpreis gewürdigt wurde [6]. Sie beruht auf der inelastischen Streuung von elektromagnetischen Wellen an molekularen Bindungen [7]. Die Gesamtheit aller detektierten Licht-Molekül-Interaktionsprozesse liefert einen einzigartigen optischen „Fingerabdruck“ der Substanz und macht somit ihre Identifizierung möglich. Im Unterschied zu anderen molekülspektroskopischen Methoden, wie Massenspektroskopie, zeichnet sich die minimal-invasive und markerfreie Raman-Spektroskopie in erster Linie durch ihre Biokompatibilität aus, die die Analyse von lebenden Zellen in wässriger Umgebung ermöglicht. Dadurch kann die Dynamik einzelner Zellen in Echtzeit untersucht werden, während sie beispielsweise auf äußere Einflüsse reagieren [8]. Diese Eigenschaften sind auch bei der Charakterisierung von biomedizinischen Proben von großem Vorteil. Anders als bei der ebenfalls zerstörungsfreien Kernspinresonanzspektroskopie sind gegenwärtig kompakte table-top Raman-Systeme für den Feldeinsatz kommerziell erhältlich [9]. Die Raman-Spektroskopie ist somit für eine Vielzahl an Anwendungen einsetzbar [10]. Allerdings handelt es sich bei der spontanen Raman-Streuung aufgrund des geringen Streuquerschnittes von ca. 10^{-30} cm² pro Molekül um einen ineffizienten Prozess [9]. Dies macht sich bemerkbar, sobald Proben analysiert werden, die nur noch wenige Raman-aktive Moleküle beinhalten. Unter Verwendung von zusätzlichen Verstärkungsmechanismen, z. B. Nahfeldeffekten, könnte die Sensitivität trotzdem bis hin zum Nachweis einzelner Moleküle gesteigert werden [11]–[13].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konfokales Raman-Spektrometer aufgebaut und charakterisiert. Die im Folgenden vorgestellten Messungen an verschiedenen biologischen und organischen Proben wurden an diesem Aufbau durchgeführt. Im Unterschied zu kommerziell erhältlichen Raman-Systemen besitzt das aufgebaute Raman-Spektrometer eine flexible Anpassungsfähigkeit an diverse Messgeometrien. Darüber

hinaus bietet es eine Reihe weiterer Vorteile: Während kommerzielle Systeme in der Regel über eine oder zwei Anregungswellenlängen verfügen, deckt das aufgebaute Raman-Spektrometer den kompletten sichtbaren und den nahen Infrarotbereich mit acht verschiedenen Anregungswellenlängen ab und kann bei Bedarf mit zusätzlichen Anregungslasern erweitert werden. Es besteht auch die Möglichkeit, fluoreszenzmarkierte Proben im Raster-Scanverfahren orts aufgelöst abzubilden und nach der Identifizierung der besonders interessanten Probenbereiche dort weiterführende Raman- oder Fluoreszenz-Spektren aufzunehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Projekte im Kontext des aktuellen Forschungsstandes vorgestellt, die sich mit Raman-Messungen an ausgewählten Proben befassen. Dabei variieren deren Abmessungen von der Mikrometer- bis zur Subnanometer-Skala. Somit mussten unterschiedliche Ansätze verwendet werden, um stets ein Raman-Signal mit ausreichender Intensität und einem akzeptierbaren Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu generieren. Diese Projekte werden im Folgenden vorgestellt.

Gegenwärtig stellen kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit die führende Todesursache für den Menschen dar [14]. Die am häufigsten auftretende Erscheinungsform der Herz-Kreislauf-Krankheiten ist die Atherosklerose, die auf die Einlagerung von lipidreichem Material aus der Blutbahn in die Arteriengefäßwände und eine damit verbundene Stenose zurückzuführen ist. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien werden solche neoplastischen Verdickungen der arteriellen Wand als Plaques bezeichnet [15]. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Größe und Ausdehnung als auch in ihrer Komposition und der damit einhergehenden Stabilität. Instabile Plaques weisen beispielweise ein erhöhtes Risiko einer Gefäßthrombose auf, die im schlimmsten Fall einen Herzinfarkt herbeiführen kann. Die im klinischen Alltag etablierten Diagnostikmethoden, wie optische Kohärenztomographie oder Übersichtsfärbungen, helfen zwar bei der Lokalisierung und Stadieneinteilung von Plaques, liefern jedoch keine Informationen über deren biochemische Zusammensetzung [16], [17]. Demzufolge lassen sich keine eindeutigen Aussagen über die Plaque-Vulnerabilität und somit auch über mögliche Komplikationen treffen [15].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Aorta-Gewebeschnitte untersucht, die von Patienten hohen Alters im Rahmen einer Herztransplantation am Herz- und Diabeteszentrum in Bad Oeynhausen operativ entnommen wurden (s. Kap. 4.1). Das Ziel dieses Projektes ist die Demonstration der Anwendbarkeit und der Zweckmäßigkeit der spontanen Raman-Spektroskopie zur Charakterisierung von Gewebeproben mit solchen krankhaften Veränderungen zu demonstrieren. Dabei steht die Unterscheidung zwischen atherosklerotischem und gesundem Gewebe anhand deren chemischen Zusammensetzung im Vordergrund. Es soll überprüft werden, ob durch die aufgenommenen Raman-Spektren auch zwischen verschiedenen Plaquestadien differenziert werden kann und ob daraus wichtige Informationen bezüglich der Gefahr eines kardiovaskulären Ereignisses für den betroffenen Patienten erhalten werden können.

Aufgrund der zunehmenden Knappheit von fossilen Brennstoffen verlagert sich der Fokus allmählich immer mehr zu regenerativen bzw. nachwachsenden Energiequellen [18]–[20]. In Kapitel 4.2 wird die chemische Zusammensetzung der ölreichen Mikroalge *Monoraphidium neglectum* untersucht, die als potentielle Biokraftstoffquelle für die Biotechnologie von Interesse sein könnte. Unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. Stickstoffmangel, besitzt diese Algenart die Fähigkeit, sogenannte Speicherlipide überwiegend in Form von Triacylglyceriden intrazellulär anzureichern. Diese können zu Fettsäurenmethylestern und anschließend zu Biokraftstoff weiterverarbeitet werden. Im Hinblick auf die Stabilität des synthetisierten Öls werden gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren bevorzugt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung von *M. neglectum* in verschiedenen Lipid-Anreicherungsstadien, die durch unterschiedliche Einwirkdauer der wachstumsfördernden Faktoren bestimmt sind. Basierend auf den aufgenommenen Raman-Daten konnte aus dem Akkumulationsverhalten einzelner Algen geschlossen werden, dass dieser Algenstrang aufgrund seiner hohen Produktivität an gesättigten Fettsäuren sehr vielversprechend für biotechnologische Anwendungen sein könnte.

Daraufhin wurden noch kleinere Systeme, organische Filme, untersucht, die eine axiale Ausdehnung von wenigen Nanometern hin bis zu Subnanometern besitzen und nur eine geringe Anzahl von Raman-aktiven Molekülen enthalten (s. Kap. 4.3). Diese molekularen Schichten sind normalerweise auf um 3-4 Größenordnungen dickere Trägermaterialien aufgetragen, die ein starkes, störendes fluoreszentes Untergrundsignal generieren. Zusätzlich dazu emittieren Nanofilme infolge der linearen Abhängigkeit des Raman-Signals von der Konzentration der jeweiligen Spezies im Messvolumen nur ein sehr schwaches Raman-Signal. Es muss daher ein Verstärkungsmechanismus benutzt werden, um ein detektierbares Raman-Signal zu erzeugen [21]. Dafür wird hier ein plan-konvexer Nanoresonator aufgebaut und seine Anwendbarkeit für die Analyse dünner Schichten anhand von Polymeren und Graphen-Monolagen gezeigt (s. Kap. 4.3). Dabei erfolgte die Bestimmung der erzielten Signalverstärkung durch den Vergleich des Raman-Signals von einer Probe in einer Kavität hoher Güte mit dem von einer Probe in einer Kavität niedriger Güte.

In manchen Fällen, z. B. in der Bioanalytik, ist die Detektion von nur noch wenigen Molekülen notwendig [11]. Um dies zu gewährleisten, wird die zu analysierende Substanz in direkten Kontakt mit plasmonisch-aktiven metallischen Nanostrukturen gebracht [22], [23]. Durch die optische Anregung der Nanostrukturen entstehen um diese herum Nahfeldüberhöhungen, die zu einer signifikanten Raman-Signalverstärkung des Analyten um einen Faktor von bis zu 10^{14} führen [23], [24]. In der einschlägigen Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele für die Verwendung von fraktionierten Nanopartikeln zur Raman-Signalverstärkung finden [25], [26]. Die Separation von Nanopartikeln nach Größe mit einem anschließenden Mediumaustausch geht aber oft mit der Desorption der an der Metalloberfläche adsorbierten Moleküle einher [27]. Demzufolge lässt sich die Gesamtzahl der Moleküle in der präparierten Lösung nicht mehr abschätzen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Messungen an nicht-fraktionierten und nicht-aufgereinigten Dispersionen, die aus verschiedenen Nanopartikel-Aggregaten bestanden (s. Kap. 4.4). Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung der durch Dimer-Strukturen (Nanopartikel-Linker-Molekül-Nanopartikel) induzierten Raman-Verstärkung. Besonders die Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ist von großer Bedeutung, da die größte Signalverstärkung für eine resonante Anregung der plasmonisch-aktiven Nanopartikel erwartet wird. Durch die Verfügbarkeit von verschiedenen Anregungswellenlängen am aufgebauten Raman-Spektrometer konnte die Signalerhöhung infolge von resonanter und nicht-resonanter Anregung untersucht werden. Dabei wurden die Messergebnisse durch numerische Simulationen ergänzt. Daraufhin erfolgte die Bestimmung der im beschriebenen Dimer-System erzielten Signalverstärkung, indem ein Vergleich mit der konventionellen (spontanen) Raman-Spektroskopie an Linker-Molekülen ohne Nanopartikel durchgeführt wurde. Anschließend wurden die berechneten Werte mit den in der Literatur angeführten Verstärkungsfaktoren in Beziehung gesetzt.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der spontanen Raman-Spektroskopie beschrieben. Das Kapitel 2.1 gibt einen kurzen Rückblick auf die historische Entwicklung dieser optischen Untersuchungsmethode. Daraufhin wird in Kapitel 2.2 auf die fundamentalen Konzepte der Licht-Materie-Wechselwirkung und die damit verbundene Entdeckung des Raman-Effekts eingegangen. Dieser bildet die Grundlage für die Raman-Spektroskopie. In Kapitel 2.3 wird das theoretische Modell des klassischen und quantenmechanischen harmonischen Oszillators für die Beschreibung der Schwingungen eines zweiatomigen Moleküls dargestellt. Im Zusammenhang mit Raman-aktiven Schwingungen werden der Begriff der Polarisierbarkeit und die Auswahlregeln in Kapitel 2.4 eingeführt.

2.1 Historisches

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Streuung elektromagnetischer Wellen zum Objekt intensiver Forschung [6], [28]. Bereits 1923 sagte der österreichische Physiker Adolf Smekal in seiner Arbeit „Zur Quantentheorie der Dispersion“ voraus, dass bei der Streuung von Licht an Materie Frequenzen im Streulicht vorkommen, die im anregenden Strahl nicht präsent waren [29]. Fünf Jahre später wurde „A New Type of Secondary Radiation“ von C. V. Raman und seinem Kollegen K. S. Krishnan durch Messungen an 60 verschiedenen Flüssigkeiten experimentell nachgewiesen [7].

Der historische Aufbau von Raman und Krishnan zur Beobachtung der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Als Anregungslichtquelle diente die Sonnenstrahlung, die mit Hilfe einer Linse zuerst parallelisiert und mit einer weiteren in die Probe fokussiert wurde. Raman und Krishnan benutzten komplementäre Filter, um die Frequenz- und damit die Wellenlängenveränderung zu beobachten. Beispielsweise wurde bei einem Violett-Anregungsfilter ein Grün-Filter vor dem Detektor verwendet. Als Detektor diente dabei das menschliche Auge. Dieser Effekt der inelastischen Lichtstreuung wurde später nach einem seiner Entdecker als Raman-Effekt benannt und 1930 mit dem Nobelpreis gewürdigt [30].

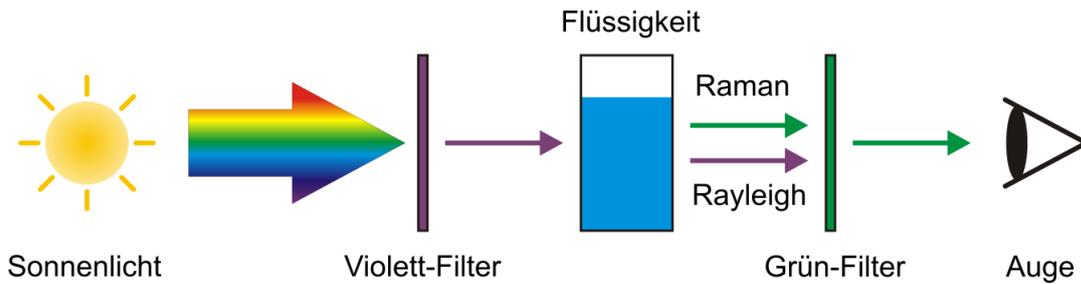


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus von C. V. Raman zur Beobachtung von Raman-Streuung in Flüssigkeiten. Als Lichtquelle dient die Sonne, aus deren Strahlung mittels eines Filters eine violette Wellenlänge herausgefiltert und durch eine transparente Flüssigkeit geschickt wird. Das an den Flüssigkeitsmolekülen gestreute Licht setzt sich sowohl aus violetterem als auch aus beispielsweise grünem Licht zusammen. Der violette Lichtanteil stellt Rayleigh-gestreuete Photonen mit der gleichen Frequenz, wie der einfallende Strahl, dar. Der grüne Strahlanteil besteht aus Raman-gestreuten Photonen, die eine andere Frequenz (hier: kleinere Frequenz) als die einfallenden Photonen besitzen. Mit Hilfe eines weiteren Filters lässt sich der grüne Lichtanteil vom restlichen Streulicht separieren und kann mit bloßem Auge beobachtet werden.

Im Jahre 1928 konnten die russischen Physiker G. Landsberg und L. Mandelstam den gleichen Effekt in Quarz-Kristallen beobachten [31]. Zeitgleich versuchte der französische Physiker J. Cabannes, die inelastische Streuung an Gasen nachzuweisen. Dies konnte ihm jedoch aufgrund zu geringer Anregungs- und Raman-Intensitäten nicht gelingen [32]. Im Zeitraum zwischen 1928 und 1934 wurden über 500 Publikationen veröffentlicht, die sich mit dem Raman-Effekt befassen. Im Jahre 1934 erschien ein detaillierter Übersichtsartikel von Placzek, in dem die damaligen Kenntnisse zusammengefasst wurden [33].

Daraufhin folgte eine lange Pause, denn der Raman-Effekt beruht auf einem sehr ineffizienten Prozess und die Detektion des Raman-Signals ist dementsprechend schwierig ohne leistungsstarke monochromatische Lichtquellen, empfindliche Detektoren und Filter zur Trennung des Anregungslichts und gestreuten Lichts. Infolgedessen verlagerte sich der Schwerpunkt zur Infrarotspektroskopie [28]. Erst mit der Erfindung des Lasers in den 60er-Jahren und mit der Weiterentwicklung von Detektoren, Filtern und anderen Komponenten in den 80-er und 90-er-Jahren erlebte die Raman-Spektroskopie ihre Renaissance [6]. Die neuartigen Raman-Apparaturen verbesserten deutlich die Anwendbarkeit dieser spektroskopischen Methode und machten sie auch für Forscher aus nicht-physikalischen Bereichen, wie Biologie, Medizin, Chemie, Archäologie etc. attraktiv [30]. Die steigende Relevanz der Raman-Spektroskopie ist auch in der Zahl der Publikationen erkennbar: Im Jahre 1992 wurden 141 Raman-bezogene Abhandlungen veröffentlicht und im Jahre 2012 waren es bereits 2300 [34].

2.2 Licht-Materie-Wechselwirkung

Die Raman-Streuung wird durch fundamentale Licht-Materie-Wechselwirkungen hervorgerufen. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben. In Kapitel 2.2.1 wird die Interaktion zwischen einem Atom und einem Photon betrachtet. Es ist das denkbar einfachste System, das die Veranschaulichung der grundlegenden Konzepte der Licht-Materie-Wechselwirkung ermöglicht. Dieses Modell wird dann in Kapitel 2.2.2 auf die komplexere Wechselwirkung von Licht mit Molekülen übertragen. Die daraus resultierenden inelastischen Streuprozesse, wie Stokes-Raman- und Anti-Stokes-Raman-Streuung, werden ebenfalls in Kapitel 2.2.2 vorgestellt. In der Regel werden Raman-Messungen ohne zusätzliche Verstärkungsmechanismen von der spektral breitbandigen Fluoreszenz von Proben und/oder Trägermaterialien begleitet. Diese wird in Kapitel 2.2.3 beschrieben und es werden außerdem Methoden zu deren Unterdrückung vorgestellt.

2.2.1 Atom-Licht-Wechselwirkung

Die lineare Wechselwirkung von einem Atom, bestehend aus einem positiv geladenen Atomkern und einer negativ geladenen Elektronenhülle, mit einem Photon kann auf drei unterschiedliche Arten erfolgen (s. Abb. 2).

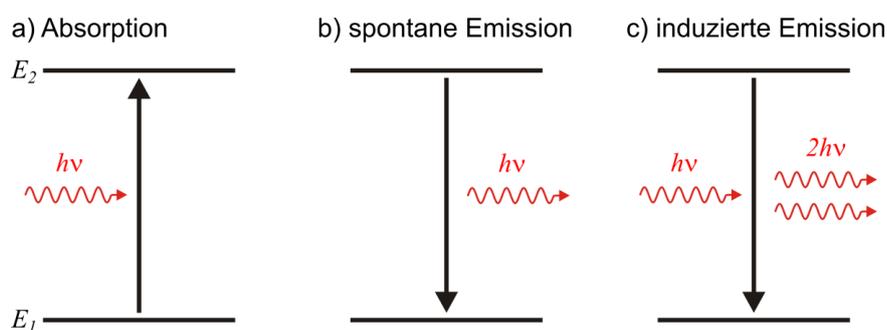


Abb. 2: Mögliche Prozesse der Licht-Materie-Wechselwirkung zwischen einem Atom und einem Photon, veranschaulicht anhand des Zwei-Niveau-Systems: a) Absorption, b) spontane und c) induzierte Emission. E_1 und E_2 sind dabei die elektronischen Energieniveaus, deren Differenz der Energie des anregenden Photons entspricht: $E_2 - E_1 = h\nu$.

Der Vorgang, bei dem die Energie eines Photons auf ein Atom übertragen wird, welches infolgedessen vom Grundzustand E_1 in den angeregten Zustand E_2 übergeht, wird als Absorption bezeichnet (s. Abb. 2a). Bei der Absorption kann das eingestrahlte Photon

aufgenommen und anschließend isotrop emittiert werden. Dieser Prozess wird Streuung genannt.

Im Fall der spontanen Emission (s. Abb. 2b) befindet sich das Atom, z. B. durch Energiezufuhr in Form von Lichteinstrahlung, bereits in einem angeregten Zustand E_2 und geht ohne externe Einflüsse unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand E_1 über. Spontane Emissionsprozesse sind inkohärent, d. h. sie erfolgen unkorreliert und unter Ausstrahlung in alle Raumrichtungen.

Der spontanen Emission steht die stimulierte (oder induzierte) Emission entgegen. Trifft ein Photon auf das bereits angeregte System, so relaxiert das Elektron unter Aussendung eines weiteren Photons in den Grundzustand E_1 (s. Abb. 2c). Das emittierte Photon verhält sich dabei kohärent (gleiche Frequenz, Phase, Polarisation, Richtung) zum einfallenden Photon.

2.2.2 Molekül-Licht-Wechselwirkung

Zwei oder mehrere Atome können sich durch kovalente Bindungen zu größeren Verbänden, Molekülen, zusammenfügen. Im Unterschied zu einem einzelnen Atom, in dem überwiegend die Elektronenanregung möglich ist, führt die Wechselwirkung der Atome innerhalb eines Moleküls zur Ausbildung einer komplizierteren Potenziallandschaft. Diese bewirkt die Entstehung zusätzlicher Anregungsniveaus, wie Rotationsanregung (infolge der Bewegung um die Hauptträgheitsachse) und Schwingungsanregung (infolge der periodischen Bewegung der Atome relativ zueinander). Die Interaktion der Moleküle mit Photonen kann Änderungen dieser Zustände verursachen. Die typischerweise in Molekülen auftretenden Anregungsenergien der Zustände sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Art der Anregung	Anregungsenergie [eV]	Entsprechender Wellenlängenbereich
Elektronenanregung	1-10	UV- und Vis-Bereich
Schwingungsanregung	0.01-0.5	Infrarotbereich
Rotationsanregung	< 0.01	Mikrowellenbereich

Tab. 1: Zusammenstellung möglicher Molekülanregungen und deren Anregungsenergien bzw. Anregungswellenlängen [35].

Die Anregungsenergien unterscheiden sich größenordnungsmäßig stark in ihren Energiebereichen voneinander. Infolgedessen besteht die Möglichkeit, durch die Wahl der Anregungswellenlänge einzelne Energiezustände gezielt anzuregen. Dies ist vor allem für spektroskopische Anwendungen von Bedeutung. Die molekularen Anregungen werden im Folgenden genauer beschrieben.

Bei der Wechselwirkung eines Photons mit einem Molekül wird das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand überführt. Dieser angeregte Zustand spaltet in Schwingungsanregungen bzw. Rotationsanregungen auf. Nach Relaxation in den Grundzustand unter Emission eines Photons wird dieser Prozess als Streuung bezeichnet. Bei Streuprozessen lässt sich eine weitere Unterteilung bezüglich der Frequenz des gestreuten Lichts in elastische und inelastische Streuung vornehmen.

Bleibt die Frequenz des Photons nach dem Streuprozess unverändert, so spricht man von elastischer Streuung, wobei man je nach Größe des Objektes, an dem die Streuung stattfindet, zwischen Rayleigh- ($d \ll \lambda$) und Mie-Streuung ($d \geq \lambda$) unterscheidet. Angemerkt sei, dass die Rayleigh-Streuung ein Spezialfall der Mie-Streuung ist. Beide elastische Streuarten sind zwar kohärent, aber während die Mie-Streuung nahezu wellenlängenunabhängig ist, weist die Rayleigh-Streuung eine λ^{-4} -Abhängigkeit auf.

Wenn sich die Energie des Photons nach dem Streuvorgang ändert, dann spricht man von Raman-Streuung. Hierbei ist zu beachten, dass die Streuwahrscheinlichkeiten für die jeweiligen Streuprozesse unterschiedlich sind. Nur 1 in ca. 10^8 Photonen ist inelastisch gestreut [9], während die Streuwahrscheinlichkeit für die Rayleigh-Streuung wesentlich höher ist und bei 1 in 10^4 Photonen liegt [36].

In Abhängigkeit vom Anfangszustand des Systems unterscheidet man Stokes- und Anti-Stokes-Raman-Streuung (s. Abb. 3). Bei der Stokes-Streuung (s. Abb. 3a) befindet sich das Elektron im Grundzustand ν_0 . Nach der Interaktion mit dem Photon geht es in einen virtuellen Zustand (s. Abb. 3a, gestrichelte Linie) mit einer kurzen Lebensdauer von 10^{-16} s über [37] und kehrt anschließend unter Abstrahlung eines Photons in den ersten angeregten Vibrationszustand ν_1 über. Es ist anzumerken, dass es sich bei einem virtuellen Niveau um keinen Eigenzustand des Moleküls handelt [9]. Für das gestreute Photon beobachtet man dann eine Verschiebung zu kleineren Energien (Rotverschiebung). Andernfalls liegt der Fall der Anti-Stokes-Raman-Streuung vor (s. Abb. 3b), bei der dagegen eine Verschiebung zu größeren Energien (Blauverschiebung) stattfindet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das bereits im angeregten Zustand ν_1 befindliche Molekül (z. B. infolge thermischer Anregung) einen Teil seiner Energie an das Photon abgibt. Diese Energiedifferenz entspricht quantenmechanisch gesehen dem Abstand ($\nu_1 - \nu_0$) zwischen zwei Energieniveaus ν_0 und ν_1 einer Molekülschwingung. Auf die mathematische Beschreibung der beiden inelastischen Streuvorgänge wird ausführlich in Kapitel 2.4 eingegangen.

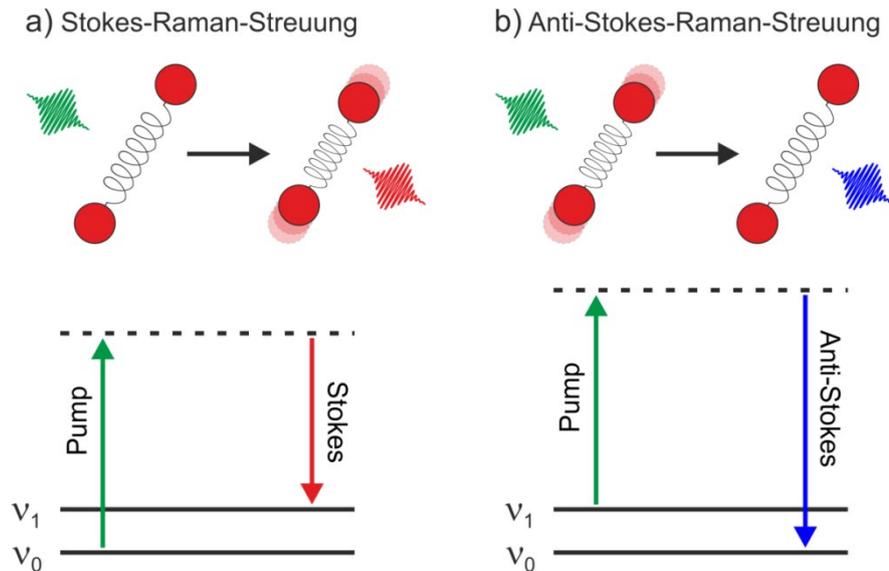


Abb. 3: Schematische Darstellung von Stokes- (a) und Anti-Stokes-Raman-Streuung (b). Die Anregung aus einem der Schwingungsgrundzustände ν_0 und ν_1 (schwarze durchgezogene Linien) findet durch ein Pump-Photon (grün) in ein virtuelles Niveau (gestrichelte schwarze Linie) statt. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist dann rotverschoben bei der Stokes-Streuung und blauverschoben bei der Anti-Stokes-Streuung.

In Abhängigkeit von der Richtung und Phase des emittierten Photons lässt sich die Raman-Streuung analog zu den Emissionsvorgängen in spontane und stimulierte Raman-Streuprozesse unterteilen. Die spontane Stokes-Raman-Streuung (s. Abb. 4a) basiert auf einem ungerichteten, nicht-kohärenten Emissionsprozess, wobei die Intensität der Streuung eine lineare Abhängigkeit von der anregenden Feldintensität aufweist. Die Photonen werden mit unterschiedlichen Frequenzen zu verschiedenen Zeiten in den kompletten Raumwinkel emittiert. Dieser Prozess bildet die Grundlage für die spontane Raman-Spektroskopie.

Der spontanen Raman-Streuung steht die stimulierte Raman-Streuung gegenüber. Dabei wird eine bestimmte Molekülschwingungsmode gezielt angeregt und dadurch ein stimulierter Emissionsvorgang induziert. Das emittierte Licht wird dann nicht isotrop, sondern räumlich und zeitlich kohärent abgestrahlt. Zu den spektroskopischen Methoden, die auf kohärenten Prozessen basieren, zählt unter anderem die kohärente Anti-Stokes Raman-Streuung (engl. *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS*).

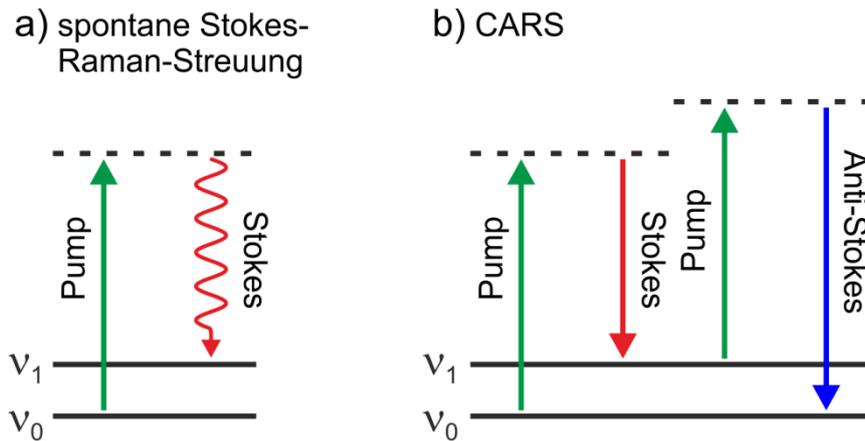


Abb. 4: Schematische Darstellung der spontanen Stokes- und kohärenten Anti-Stokes Raman-Streuung (CARS). a) Bei der spontanen Raman-Streuung wird das Elektron auf ein virtuelles Energieniveau (schwarze gestrichelte Linie) gehoben, um anschließend in den Grundzustand ν_0 durch spontane Emission unter Aussendung eines inkohärenten Photons zurückzukehren. b) Im Fall von CARS erfolgt die Anregung eines Elektrons auf ein virtuelles Niveau (schwarze gestrichelte Linie), das es nach einer kurzen Zeit wegen des Stokes-Photons wieder verlässt, um in den ersten angeregten Schwingungszustand ν_1 zurückzukehren. Daraufhin wird dieses Elektron, ausgelöst durch ein Pump-Photon, ein weiteres Mal angeregt und in einen höheren virtuellen Zustand gebracht, wobei die Photonenenergie genau zur gewünschten Mode ν_1 passen muss. Anschließend geht es in den Grundzustand ν_0 unter Abstrahlung eines kohärenten Anti-Stokes-Photons über.

Bei CARS handelt es sich um einen Vier-Wellen-Mischprozess und dementsprechend um einen nicht-linearen optischen Effekt. Seine Signalintensität übersteigt die Intensität der spontanen Raman-Streuung um bis zu fünf Größenordnungen [38]. Die kohärente Anti-Stokes Raman-Streuung kann als ein zweistufiger Prozess betrachtet werden (s. Abb. 4b). Im ersten Schritt werden zwei Laserstrahlen, Pump- und Stokes-Strahl mit den dazugehörigen Frequenzen ν_P und ν_S , in der zu untersuchenden Probe zeitlich und räumlich überlappt. Ist die Bedingung für die Raman-aktive Molekülvibration $\nu_{Molekül} = \nu_P - \nu_S$ erfüllt, so wird die Anregung von In-Phase-Schwingungen der betroffenen Moleküle induziert. Im zweiten Schritt kommt es zur inelastischen Streuung eines weiteren Pump-Photons an den nun kohärent schwingenden Molekülen und zur anschließenden Aussendung der zeitlich und räumlich kohärenten Anti-Stokes-Photonen. Deren resultierende Frequenz beträgt laut Energieerhaltung $\nu_{AS} = 2 \cdot \nu_P - \nu_S$. Die durch CARS erreichte signifikante Signalverstärkung im Vergleich zur Stokes-Raman-Streuung erfolgt durch die konstruktive Interferenz der kohärenten Anti-Stokes-Photonen.

Die Raman-Streuung bildet die Grundlage für die Raman-Spektroskopie, die gegenwärtig zu den etablierten Analysetechniken zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung gehört [10], [28]. Die Gesamtheit der Molekülschwingungen einer Substanz gleicht einem charakteristischen optischen Fingerabdruck, denn die einzelnen Schwingungsmoden sind abhängig von den jeweiligen Bindungspartnern (deren Atommasse, Anordnung zueinander, chemischer Bindung und Umgebung) und deren energetischen Zuständen (s. Kap. 2.3). Infolgedessen ist eine Substanz mit molekularer

Sensitivität eindeutig identifizierbar. Stoffe werden ohne mechanischen Kontakt analysiert und können in allen Aggregatzuständen vorliegen, wobei die geringe Dichte von Gasen die konzentrationsabhängige Raman-Streuung erschwert. Darüber hinaus bedürfen die zu analysierenden Proben keiner aufwendigen Präparation, keiner externen Marker und die Messungen können auch in wässriger Umgebung stattfinden. Dies ermöglicht unter anderem die Untersuchung von lebenden Zellen. Die oben genannten Faktoren machen die Raman-Spektroskopie zu einer wichtigen Analysetechnik für unterschiedliche Anwendungen [8], [39]–[41].

Im Fall der spontanen Raman-Streuung werden die Raman-aktiven Molekülschwingungen in Form eines Spektrums dargestellt, wobei auf die Auswahlregeln, die zu den auftretenden Schwingungsmoden führen, in Kapitel 2.4 eingegangen wird. Als Raman-Spektrum bezeichnet man die Auftragung der Signalintensität des gestreuten Lichts gegen die Raman-Verschiebung, die in der Regel als Raman-Shift bezeichnet wird. Diese Verschiebung entspricht der Energiedifferenz des eingestrahnten und des Raman-gestreuten Lichts (vgl. Abb. 3) und wird historisch bedingt in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ angegeben, die auf der Abszisse aufgetragen werden. Als Wellenzahl definiert man die Anzahl der Wellen pro Einheit und somit den Kehrwert der Wellenlänge. Obwohl die SI-Einheit von Wellenzahlen m^{-1} ist, ist die in der Spektroskopie gebräuchlichere Einheit inverse Zentimeter cm^{-1} . Die Wellenzahlen sind proportional zur Frequenz und infolgedessen energieproportionale Einheiten. Jede Raman-aktive Vibration resultiert in einem Peak mit einem Maximum, dessen Position auf der Wellenzahlachse charakteristisch für eine bestimmte Molekülschwingung ist.

Die auf der Ordinate aufgetragene Streustrahlungsintensität ist proportional zur Anzahl der von einem Detektor registrierten Photonen und kann in beliebigen Einheiten angegeben werden. Zum Beispiel kann bei der Lichtdetektion mit einem Photomultiplier im Einzelphotonenzählmodus eine Zählrate in Counts pro Sekunde verwendet werden.

In einem vollständigen Raman-Spektrum können drei Bereiche unterschieden werden: Rayleigh-, Stokes- und Anti-Stokes-Linien (s. Abb. 5). Die Rayleigh-Linie oder Anregungslinie rührt von einem elastischen Streuprozess her, hat die gleiche Frequenz wie die einfallende Strahlung und wird im Raman-Spektrum deshalb Null gesetzt (s. Abb. 5, blaue Linie). Aufgrund einer um vier Größenordnungen größeren Wahrscheinlichkeit im Vergleich zur inelastischen Streuung ist die Signalintensität der Rayleigh-Linie sehr hoch. Ausgehend von der Anregungswellenlänge besitzen die Stokes-Linien positive Wellenzahlen (Rotverschiebung) und die Anti-Stokes-Linien negative Wellenzahlen (Blauverschiebung).

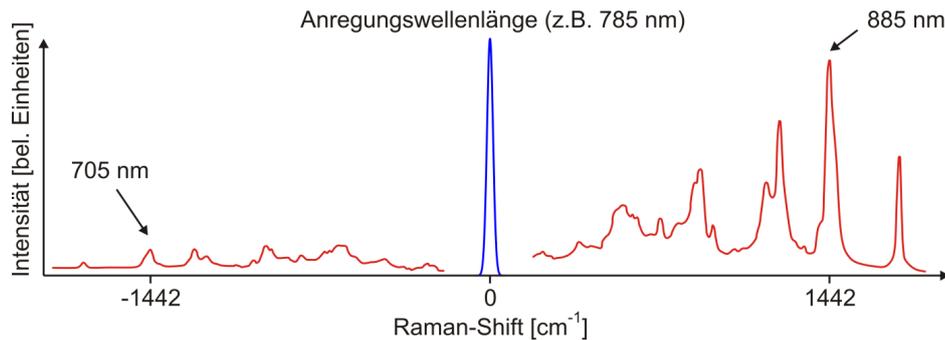


Abb. 5: Darstellung der Stokes- (rechts) und Anti-Stokes-Raman-Spektren (links) der ungesättigten Oleinsäure in Bezug auf die Laserlinie (blau). Die Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge von 785 nm, bei der sich auch die Rayleigh-Linie befindet. Mit schwarzen Pfeilen wurde exemplarisch die CH₂-Deformationsbande bei 1442 cm⁻¹ markiert, die charakteristisch für diese Fettsäure ist. Im Fall der Stokes-Streuung entspricht dies einer Wellenlänge von 885 nm und im Fall der Anti-Stokes-Streuung 705 nm (adaptiert aus [9]).

Unter normalen Bedingungen¹ sind Stokes-Linien stärker ausgeprägt als Anti-Stokes-Linien. Dies ergibt sich aus der Betrachtung der Besetzungswahrscheinlichkeiten der Schwingungszustände: Im thermischen Gleichgewicht folgt deren Besetzung der Maxwell-Boltzmann-Verteilung und ist somit temperaturabhängig. Bei Raumtemperatur befindet sich die Mehrheit der Moleküle im energetischen Grundzustand. Der Quotient aus der Anti-Stokes-Raman-Intensität I_{AS} und der Stokes-Raman-Intensität I_S ergibt sich dann zu

$$\frac{I_{AS}}{I_S} \propto \frac{N_{AS}}{N_S} \propto \exp\left(-\frac{h\nu_{vib}}{k_B T}\right) \quad (2.1)$$

Dabei ist $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ Js Planck'sches Wirkungsquantum, $k = 1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K Boltzmann-Konstante und ν_{vib} die Schwingungsfrequenz. N_{AS} steht für die Anzahl der Moleküle im angeregten vibronischen Zustand und N_S für die Anzahl der Moleküle im vibronischen Grundzustand.

Aufgrund der Ineffizienz der spontanen Anti-Stokes-Streuung bei Raumtemperatur und moderaten Laserleistungen wird für die meisten Anwendungen die intensivere spontane Stokes-Streuung bevorzugt. Hierbei sind in der Regel die Raman-Schwingungen im sogenannten Fingerabdruck-Bereich von Interesse, der zwischen ca. 500-1800 cm⁻¹ liegt. In diesem Bereich treten die Vibrationen der meisten und vor allem der biologisch relevanten Substanzen auf. Zwischen 1800 cm⁻¹ und 2800 cm⁻¹ befindet sich der sogenannte stille Bereich, in dem nur wenige Vibrationen (z. B. die Vibrationen von Schwefelverbindungen oder Alkinen) vorkommen. Zwischen 2800 cm⁻¹ und 3500 cm⁻¹

¹ Bei Raumtemperatur und moderaten Laserleistungen

lassen sich Schwingungen leichter Elemente und deren Verbindungen, wie CH₂, detektieren.

2.2.3 Fluoreszenz als Störmechanismus in der spontanen Raman-Spektroskopie

Durch die Beleuchtung mit Laserstrahlung kommt es neben der spontanen Raman-Streuung auch zur Fluoreszenzanregung. Das Fluoreszenzlicht kann sowohl von der Autofluoreszenz der zu untersuchenden Probe als auch vom verwendeten Trägermaterial stammen und führt zu einem intensiven spektral breitbandigen Untergrundsignal. Dieses verdeckt oft das deutlich schwächere Raman-Signal. In diesem Kapitel wird der Fluoreszenzbeitrag genauer betrachtet und es werden die gängigen Methoden zu dessen Reduktion bzw. nachträglichen Entfernung aus den Messdaten vorgestellt.

Die Intensität der spontanen Raman-Streuung I_R ist gegeben durch

$$I_R \propto I_0 \cdot \nu^4 \cdot N \cdot \sigma \quad (2.2)$$

Dabei ist I_0 die Anregungsleistung des Lasers, ν die Anregungsfrequenz, N die Anzahl der Raman-aktiven Moleküle im Fokusbereich und σ der Wirkungsquerschnitt für die spontane Raman-Streuung [28].

Als Wirkungsquerschnitt bezeichnet man die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit zwischen einer elektromagnetischen Welle und einem Teilchen (z. B. Molekül) und damit die Effizienz einer bestimmten Interaktion. Der Wirkungsquerschnitt wird definiert als

$$\sigma [m^2] = \frac{P_{abgestrahlt}}{S_{einfallend}} \quad (2.3)$$

$P_{abgestrahlt}$ ist dabei die infolge eines Streuvorgangs abgestrahlte Leistung und $S_{einfallend}$ die eingestrahlte Leistungsdichte, die den Streuprozess angeregt hat. Die in der Molekülspektroskopie übliche Einheit für den Wirkungsquerschnitt σ ist cm² pro Molekül. Dieser Streuparameter ist molekülspezifisch und hängt von der jeweiligen Anregungswellenlänge ab. Die typischen Streuquerschnitte für die spontane Raman-Streuung liegen im Bereich zwischen 10⁻²⁶ und 10⁻³⁰ cm² pro Molekül [23].

Wie in Kapitel 2.2.2 bereits beschrieben, kann das Molekül infolge der Absorption eines Photons in einen elektronischen angeregten Zustand überführt werden. Die dadurch aufgenommene überschüssige Energie kann auf verschiedene Weisen wieder abgegeben werden:

Strahlungslose Energieabgabe:

- photochemische Reaktion: Eine chemische Reaktion kann durch die Einstrahlung von UV-, Vis- und NIR-Licht initiiert werden.
- thermische Deaktivierung: Infolge der Zusammenstöße mit Nachbarmolekülen erfolgt die Abgabe der Energie in Form von Wärme.
- Energietransfer: Energie wird auf ein anderes Molekül (Nachbarmolekül) übertragen.

Energieabgabe mit begleitender Emission:

- Fluoreszenz: Durch die Lichteinstrahlung wird das betroffene Molekül in einen vibronischen Zustand (hier: ν_2) des ersten angeregten Elektronenzustands E_1 angehoben (s. Abb. 6). Daraufhin erfolgt eine strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand ν_0 des E_1 -Energieniveaus. Anschließend geht das Molekül in eines der vibronischen Energieniveaus (hier: ν_0 , ν_1 oder ν_2) des elektronischen Grundzustands E_0 unter Aussendung von isotropem Fluoreszenzlicht über, dessen Frequenz vom jeweiligen Übergang abhängt.

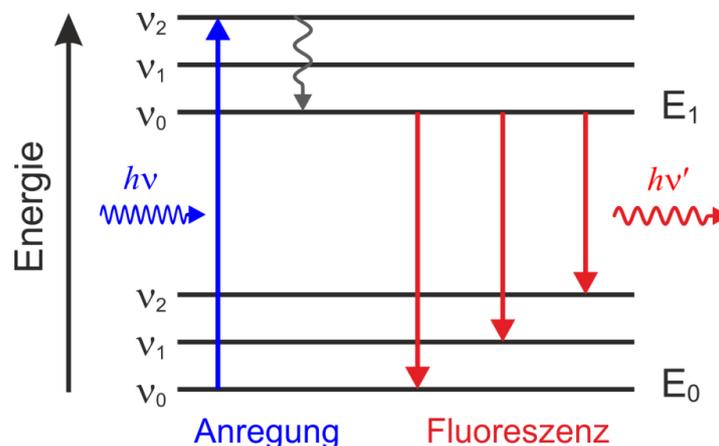


Abb. 6: Termschema der Fluoreszenz. Das einlaufende Photon (blau) induziert den elektronischen Übergang in das Vibrationsniveau ν_2 des ersten angeregten elektronischen Zustands E_1 (blauer Pfeil). Es folgt die strahlungslose Relaxation in den Vibrationszustand ν_0 desselben Zustands E_1 (gewellte graue Linie). Von dort aus kehrt das System unter Aussendung von Fluoreszenzlicht (rote Pfeile) in eines der Schwingungsniveaus des Grundzustands E_0 zurück.

Der Fluoreszenzprozess stellt ein großes Problem in der spontanen Raman-Spektroskopie dar und schränkt deren Anwendungsbereich erheblich ein. Der Wirkungsquerschnitt der

Fluoreszenz beträgt ca. $\sigma = 10^{-16} \text{ cm}^2$ pro Molekül und ist dementsprechend um mehrere Größenordnungen größer als der Streuquerschnitt des zu detektierenden Raman-Signals [23]. Das führt dazu, dass Letzteres oft vor allem bei biologischem Material bei gleichzeitiger Fluoreszenzanregung teilweise oder komplett vom dominierenden Fluoreszenz-Signal überlagert wird. Durch den Einsatz von verschiedenen instrumentellen und mathematischen Methoden lässt sich jedoch eine signifikante Minimierung bzw. Eliminierung des störenden Fluoreszenz-Signals erreichen [42]. Diese werden im Folgenden dargestellt.

Photobleaching

Längere Belichtungszeiten und hohe Laserleistungen führen zur irreversiblen Zerstörung fluoreszierender Komponenten in der vorliegenden Probe. Beispielsweise lässt sich die Fluoreszenz in Knochen durch die Anregung mit 532 nm und eine Strahlungsleistung von $3.1 \cdot 10^{10} \text{ W/cm}^2$ um einen Faktor 3 reduzieren, wenn man die Knochenprobe insgesamt 4 Stunden lang von einem Laser belichtet lässt [43]. Diese Vorgehensweise hat dementsprechend zwei Einschränkungen:

- sie funktioniert nur bei festen Proben, denn bei flüssigen oder gasförmigen Substanzen kommt es infolge der Brown'schen Bewegung zum ständigen Materialaustausch im Fokus.
- Intensive fokussierte Laserlichteinstrahlung kann die Probe thermisch aufheizen und dadurch zerstören. Besonders kritisch ist dies bei biologischem Material.

Optimierung der Anregungswellenlänge

Die meisten Elektronenübergänge in den Molekülen finden im UV- und Vis-Bereich statt (s. Tab. 1). Infolgedessen ist die Fluoreszenz in den oben genannten Spektralbereichen besonders stark ausgeprägt. Durch die geschickte Wahl der Anregungswellenlänge lässt sich die Intensität der Fluoreszenz reduzieren.

Dabei müssen allerdings folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- *Räumliche Auflösung*: Laut dem Rayleigh-Kriterium hängt das Auflösungsvermögen d linear von der Wellenlänge ab: $d = 0.61 \cdot \lambda / NA$, wobei λ die verwendete Anregungswellenlänge und NA die numerische Apertur des Objektivs ist [44]. Beispielsweise beträgt für ein 40x Objektiv mit $NA = 0.75$ und einer Anregung mit $\lambda = 325 \text{ nm}$ das theoretische Auflösungsvermögen $d = 0.26 \text{ }\mu\text{m}$. Für die Anregung mit $\lambda = 785 \text{ nm}$ beträgt es dagegen $d = 0.64 \text{ }\mu\text{m}$.
- *Intensität des Raman-Signals*: Da das Raman-Signal proportional zur Anregungsfrequenz (s. Gl. 2.2) und somit umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Anregungswellenlänge ist, lassen sich mit kürzeren Wellenlängen höhere Intensitäten erreichen [45]. Zum Beispiel fällt die Intensität des Raman-Signals bei den ansonsten gleichen Randbedingungen für die Anregung mit

785 nm 34 mal geringer aus, als bei der Anregung mit 325 nm. Darüber hinaus nimmt die Empfindlichkeit der meisten Detektionsgeräte, wie CCD-Kameras, im NIR-Bereich ab. Dafür besteht bei Anregung im UV-Bereich aufgrund der energiereichen Photonen die Gefahr der photochemischen Zersetzung der zu analysierenden Probe [46].

- *Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz:* Infolge der im Vergleich zur kurzwelligeren Strahlung größeren Eindringtiefe und der geringeren lichtinduzierten Zerstörung werden für biologische Anwendungen NIR-Laser im Wellenlängenbereich zwischen 700 nm und 1000 nm bevorzugt („therapeutisches Fenster“) [47]. Im Fall von Biomolekülen, wie DNA oder Proteinen, kommt jedoch auch eine resonante Anregung mit der UV-Laserstrahlung in Frage [48], [49]. Für anorganische Proben eignen sich Laser insbesondere im blauen und grünen Spektralbereich [50].

Räumliche Begrenzung des betrachteten Fokusvolumens durch Konfokalität

Das Grundprinzip der Konfokalität beruht auf der Verkleinerung des detektierten fokalen Volumens durch einen räumlichen Filter. Dies resultiert in einer erhöhten axialen Auflösung und damit in einer Kontrasterhöhung [51]. Im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie lässt sich dadurch eine Verbesserung der lateralen Auflösung um einen Faktor 1.4 erzielen [52].

Die Konfokalität kann sowohl durch den Einsatz einer Blende als auch durch eine Faser erreicht werden. In Abbildung 7 ist exemplarisch das mit einer Blende realisierte konfokale Prinzip dargestellt.

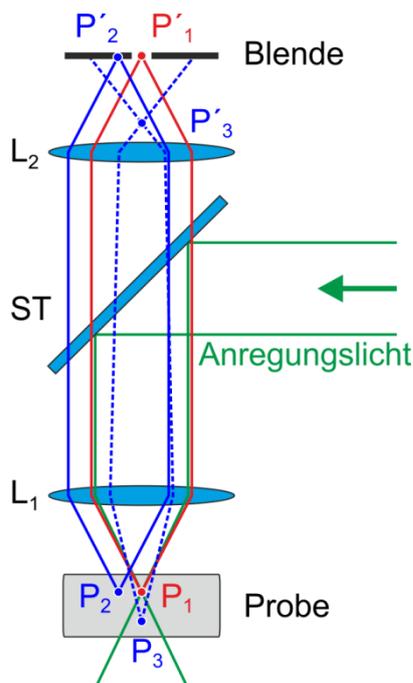


Abb. 7: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines konfokalen Mikroskops. Das Anregungslicht (grün) wird vom Strahlteiler (ST) zur Probe hin reflektiert und mittels einer Linse L_1 auf die Probe fokussiert. Hier werden exemplarisch drei Probenpunkte P_1 , P_2 und P_3 mit den dazugehörigen Strahlengängen (P_1 : durchgezogen rot, P_2 durchgezogen blau, P_3 gestrichelt blau) gezeigt. Der Punkt P_1 liegt im Fokus, während P_2 und P_3 sich oberhalb oder unterhalb der Fokalebene befinden. Von den Probenpunkten aus passiert das gestreute Licht den dichroitischen Strahlteiler. Nach der Bündelung der Strahlen mit der Linse L_2 entstehen drei Foki P'_1 , P'_2 und P'_3 , die den Probenpunkten P_1 , P_2 und P_3 zugeordnet sind. Im Fokus der Linse L_2 befindet sich eine Lochblende. Nur P'_1 kann die Blende passieren. P'_2 und P'_3 , die den Probenstellen außerhalb der Fokalebene entsprechen, werden von der Blende abgeblockt und damit nicht detektiert.

Die Blende blockiert dabei den Strahlengang von Licht, das aus Ortspunkten außerhalb des Anregungsvolumens emittiert wird (s. Abb. 7, Punkte P2 und P3). Der Durchmesser der Apertur legt den Grad der Konfokalität fest und hängt von der Anwendung ab. Wird der Durchmesser der Blende groß gegenüber dem Laserfokus gewählt, so wird auch ein größerer Anteil des störenden Streulichts detektiert. Ist der Durchmesser aber zu klein, so führt dies zum Abschneiden des zu detektierenden Signals und damit zur Verringerung der resultierenden Signalstärke. Für die konfokale Mikroskopie benutzt man in Kombination mit hochnumerischen Objektiven üblicherweise Blenden mit einem Durchmesser, der kleiner als $25\ \mu\text{m}$ ist [53]. Unter Voraussetzung einer hinreichend guten Justage lässt sich der Streulichtanteil deutlich reduzieren. Aufgrund des geringen Wirkungsquerschnittes der Raman-Streuung sind für die spontane Raman-Spektroskopie größere Aperturen von ca. $50\ \mu\text{m}$ notwendig, um möglichst viele Raman-Photonen einzusammeln und trotzdem einen gewissen Grad an Konfokalität zu gewährleisten.

Optische Falle

Gängige Trägermaterialien für die spontane Raman-Spektroskopie, wie z. B. Borosilikat-Glas (BK7), zeigen aufgrund von herstellungsbedingten Verunreinigungen eine hohe Eigenfluoreszenz vor allem bei Anregung im NIR-Bereich (s. Kap. 3.3). Dieser eignet sich jedoch besonders gut für die Analyse von biologischen Proben [47]. Um die Autofluoreszenz weitgehend zu vermeiden, besteht die Möglichkeit, mikroskopische Objekte (von einigen Mikrometern hin bis zu einigen Nanometern) in einem stark fokussierten gaußförmigen Laserstrahl mit hinreichendem Abstand zur Substratoberfläche einzufangen [54]. Dabei werden Kräfte im Bereich von pN bis hin zu nN auf die eingefangenen Partikel ausgeübt [55]. Diese Methode wird als optische Pinzette oder optische Falle bezeichnet und kommt überwiegend für die Messungen an Zellen oder Biomolekülen [40] und lokale Viskositätsmessungen [56] zum Einsatz. Die Kombination dieses Prinzips mit der spontanen Raman-Spektroskopie führt zur erheblichen Reduzierung des störenden Fluoreszenzbeitrages vom Trägermaterial gegenüber dem Raman-Signal.

Das Grundprinzip der optischen Falle besteht darin, dass die einfallenden Photonen bei der Wechselwirkung mit der Probe eine Richtungsänderung erfahren, die ihrerseits mit einer Impulsänderung einhergeht. Laut Impulserhaltungsgesetz erfährt auch die Probe, mit der die Photonen wechselwirken, infolge eines Impulsübertrages ebenfalls eine Impulsänderung. In Abhängigkeit von der Objektgröße unterscheidet man zwischen dem Mie-Regime für $d \gg \lambda$ und dem Rayleigh-Regime $d \ll \lambda$, wobei die Kräfte im Mie-Bereich durch die geometrische Optik beschrieben werden können [54], [57]. Im Weiteren wird nur dieser betrachtet.

Auf das im Fokus eingefangene Partikel wirken zwei Kräfte (s. Abb. 8):

- *Streukraft* \mathbf{F}_{Streu} , die durch Streuung von Licht an der Probe hervorgerufen wird und als Strahlungsdruck verstanden werden kann. Dementsprechend ist sie in die Ausbreitungsrichtung des Strahls gerichtet. Die Streukraft lässt sich im Teilchenbild mit Hilfe der spontanen Streuung erklären (vgl. Kap. 2.2.2) und ist proportional zur eingestrahnten Lichtintensität.
- *Gradientenkraft* oder *Brechungskraft* \mathbf{F}_R , die durch Brechung von elektromagnetischen Wellen am Partikel herrührt und zum Fokus hin gerichtet ist. Diese Kraft lässt sich im Wellenbild durch die Entstehung eines elektrischen Dipols infolge der Wechselwirkung eines dielektrischen Partikels mit dem elektrischen Feld beschreiben. Der vom Lichtfeld erzeugte Dipol wechselwirkt wiederum mit dem elektrischen Feld. Ist letzteres inhomogen, d. h. es besteht ein Intensitätsgradient, so tritt eine Kraft auf, die zum Ort der höchsten Intensität, dem Fokus, gerichtet ist. Dieser Intensitätsgradient lässt sich zum Beispiel durch die starke Fokussierung des Laserstrahls mit einem hochnumerischen Objektiv ($NA \geq 1$) realisieren.

Beide Kräfte wirken in entgegengesetzte Richtungen: Die Streukraft \mathbf{F}_{Streu} treibt das eingefangene Objekt aus der Falle heraus, während die Gradientenkraft \mathbf{F}_R das Teilchen wieder in den Brennpunkt zieht.

Eine stabile dreidimensionale Falle lässt sich erreichen, wenn die Gradientenkraft \mathbf{F}_R die entgegenwirkende Streukraft \mathbf{F}_{Streu} überwiegt. Ein Gleichgewicht stellt sich ein, wenn die Beiträge der beiden Kräfte gleich sind. Wirken auf das eingefangene Objekt noch weitere Kräfte, wie z. B. thermische Kräfte oder Reibungskraft im umgebenen Medium, so erfolgt die Einstellung des Gleichgewichtszustands unter der Voraussetzung, dass die Vektorsumme aller beteiligten Kräfte gleich Null ist. Die Gleichgewichtslage ist dabei allerdings nicht direkt im Laserfokus, sondern aufgrund der Streukraft etwas in die Lichtpropagationsrichtung entlang der optischen Achse verschoben.

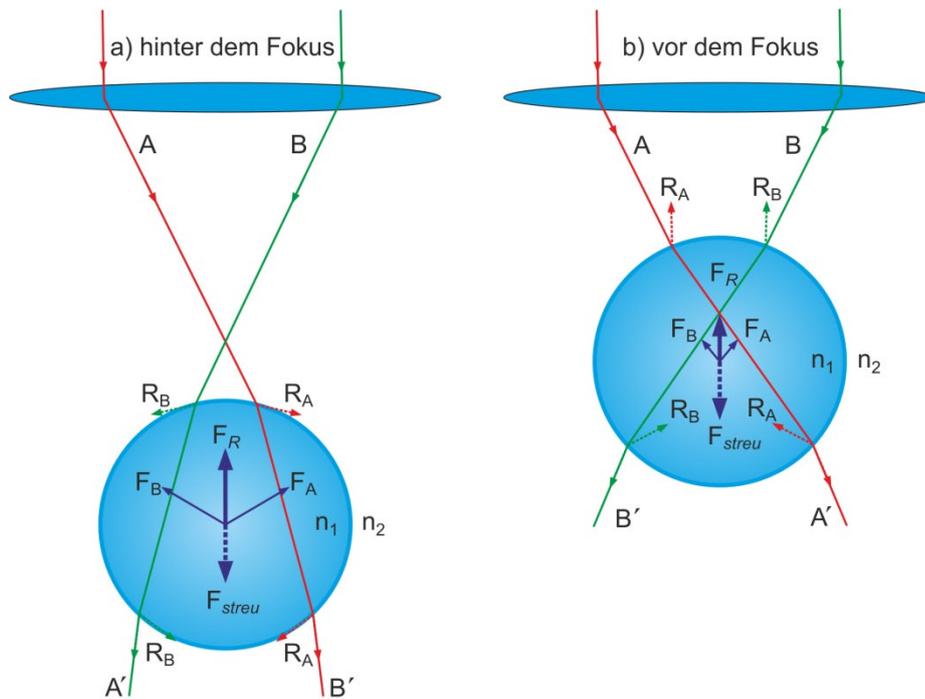


Abb. 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise der optischen Falle für den Mie-Fall ($d \gg \lambda$) anhand eines kugelförmigen dielektrischen Partikels. Eine hochnumerische Linse fokussiert die beiden Strahlen A (rot) und B (grün) auf das zu untersuchende Partikel. Mit n_1 und n_2 sind jeweils die Brechungsindizes des Partikels und des umgebenden Mediums bezeichnet, wobei $n_1 > n_2$ gilt. Neben der Brechung finden auch die Reflexion und Streuung der Einfallstrahlen am Partikel statt, wobei diese Lichtstrahlen R_A und R_B durch gestrichelte Linien gekennzeichnet sind. Auf das Kügelchen wirken zwei entgegengesetzt gerichtete Kräfte: Streu- und Brechkraft: Die Streukraft F_{Streu} rührt von den Reflexionen an der Oberfläche des Partikels beim Ein- und Austritt her und zieht das Partikel aus der Falle heraus, während die Brechkraft F_R es wieder in den Brennpunkt zieht. In a) ist die Situation gezeigt, wenn sich das eingefangene Objekt aus Sicht der Laserquelle hinter dem Fokus befindet. Sowohl beim Ein- als auch Austritt findet eine Brechung statt, die zur Richtungsänderung des Impulses führt. Die resultierende Gradientenkraft $F_R = F_A + F_B$ wirkt der Streukraft F_{Streu} entgegen und dementsprechend in Richtung des Laserfokus. In b) ist die Situation dargestellt, in der sich das dielektrische Partikel vor dem Fokus befindet. Nach der Brechung kommt es ebenfalls zur entsprechenden Richtungsänderung des Impulses. Auf das eingefangene Objekt wirkt eine resultierende Kraft F_R , die in Ausbreitungsrichtung des Laserlichts zeigt. Die Einfallstrahlen A und B mit der geänderten Richtung werden mit jeweils A' und B' bezeichnet [58].

Für Partikel, die größer als das Zehnfache der verwendeten Anregungswellenlänge sind (im Mie-Regime), kann die resultierende Gesamtkraft \mathbf{F}_{Gesamt} im Rahmen der Strahlenoptik für eine ideale optische Falle folgendermaßen bestimmt werden:

$$\mathbf{F}_{Gesamt} = \frac{n \cdot P}{c} \quad (2.4)$$

Dabei ist n der effektive Brechungsindex, der ein Quotient aus dem Brechungsindex des Partikels n_1 und dem Brechungsindex des umgebenden Mediums n_2 darstellt, P die Laserleistung im Fokus und c die Lichtgeschwindigkeit [57].

In Abbildung 9 ist ein eingefangenes Polystyrol-Partikel ($n_{\text{Partikel}} = 1.6$) mit einem Durchmesser von $8 \mu\text{m}$ in wässriger Umgebung ($n_{\text{Wasser}} = 1.33$) gezeigt. Mit einer fokalen Leistung des einfallenden Laserstrahls von $P = 12 \text{ mW}$ ergibt sich nach Gleichung 2.4 die Gesamtkraft zu $\mathbf{F}_{\text{Gesamt}} = 48.12 \text{ pN}$.

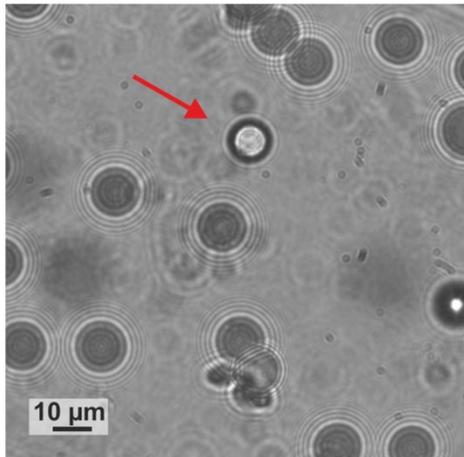


Abb. 9: Durchlichtmikroskopie-Aufnahme eines $8 \mu\text{m}$ großen Polystyrol-Partikels in wässriger Umgebung auf einem Borosilikat-Objektträger, wobei der rote Pfeil auf das im Laserfokus eingefangene Polystyrol-Partikel zeigt. Für die optische Falle wurden ein $60\times$ Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2), eine Anregungswellenlänge von 785 nm und eine fokale Leistung von 12 mW verwendet.

Dabei handelt es sich allerdings um einen theoretischen Wert, die experimentell bestimmten Kräfte sind in der Regel kleiner und weisen eine lineare Abhängigkeit von der Effizienz der optischen Falle auf [54]. Diese Effizienz hängt sowohl von den Laserfokuseigenschaften (Fokusgröße, Strahlprofil, Wellenlänge etc.) als auch von den optischen Eigenschaften des eingefangenen Objektes (Größe, Form, Material und dessen Position im Strahl) ab und spiegelt sich im dimensionslosen Effizienzfaktor Q wider [59]. Infolgedessen wird die Gleichung 2.4 erweitert zu:

$$\mathbf{F}_{\text{Gesamt, korrigiert}} = Q \left(\frac{nP}{c} \right) \quad (2.5)$$

Die typischen Effizienz-Werte für Polystyrol-Partikel liegen erfahrungsgemäß zwischen $Q = 0.03$ und $Q = 0.1$ [57]. Dementsprechend können die tatsächlichen von der optischen Pinzette auf das $8 \mu\text{m}$ große Partikel ausgeübten Kräfte je nach Effizienz der optischen Falle im Bereich zwischen $\mathbf{F}_{\text{Gesamt, korrigiert}} (Q = 0.03) = 1.44 \text{ pN}$ und $\mathbf{F}_{\text{Gesamt, korrigiert}} (Q = 0.01) = 4.81 \text{ pN}$ liegen. Diese Werte stimmen mit den typischen auf mikrometergroße Partikel wirkenden Kräften überein, die sich in der Literatur finden lassen [60].

Modulation des Raman-Signals

Eine alternative Methode zur Fluoreszenzunterdrückung nutzt die Abhängigkeit des Raman-Signals von der Anregungswellenlänge aus: Wird diese geringfügig spektral verschoben, so verschiebt sich auch das Raman-Signal, während die breite und homogene Emission der Fluoreszenz nahezu konstant bleibt. Daraufhin lässt sich der störende Untergrund aus dem ursprünglichen Raman-Spektrum mit Hilfe von mathematischen Algorithmen subtrahieren.

Es gibt verschiedene Ansätze, um die Verschiebung des Raman-Signals experimentell zu realisieren:

- Shreve et. al verwendeten beispielsweise zwei leicht unterschiedliche Wellenlängen, um die Verschiebung des Raman-Signals zu erzeugen [61]. Um eine möglichst optimale Eliminierung des Fluoreszenz-Signals zu erreichen, muss die Differenz zwischen den beiden Anregungswellenlängen in der Größenordnung der Halbwertsbreite der betrachteten Raman-Signale liegen und somit ca. $\Delta k \approx 10 \text{ cm}^{-1}$ betragen [61]. Daraufhin werden die beiden mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommenen Spektren I_1 und I_2 voneinander subtrahiert. Das dadurch entstandene Differenzspektrum $I_{\text{Differenz}} = I_2 - I_1$ enthält nur das Raman-Signal. Es kann nun mit Hilfe von mathematischen Methoden, z. B. durch Integration, gewonnen werden. Diese Analyseverfahren ist unter dem Namen der anregungslinienverschobenen Raman-Differenzspektroskopie (engl. *Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy*, *SERDS*) bekannt [62].
- Eine vergleichbare Methode basiert auf der kontinuierlichen Variation der Anregungswellenlänge und wird als Wellenlängen-modulierte Raman-Spektroskopie (engl. *Wavelength-Modulated Raman Spectroscopy*, *WMRS*) bezeichnet. Der wesentliche Unterschied zu SERDS besteht darin, dass es sich nicht um zwei verschobene Wellenlängen, sondern um die periodische Modulation der Anregungswellenlänge ($\delta\nu = 40\text{-}120 \text{ GHz}$) in Kombination mit einer Multi-Channel Lock-In-Detektion handelt [63]. Im Vergleich zu SERDS werden durch die Verwendung einer größeren Anzahl an Modulationsfrequenzen zusätzlich zur Fluoreszenzeliminierung noch eine Reduzierung des elektronischen 1/f-Rauschens und somit ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den resultierenden Raman-Spektren erreicht [64].
- Eine spektrale Verschiebung des Raman-Signals kann ebenfalls auf der Detektionsseite realisiert werden. Bei Verwendung eines Spektrometers in der Czerny-Turner-Konfiguration wird dazu das Gitter gedreht, wodurch eine Winkeländerung des gebeugten Strahls erzielt wird [65]. Damit lassen sich ebenfalls zwei leicht spektral verschobene Raman-Spektren aufnehmen, die im Anschluss mit entsprechenden Algorithmen ausgewertet werden können [63], [66].

Die hier vorgestellten Modulationsverfahren zur Fluoreszenzunterdrückung weisen unterschiedliche Effizienzen auf und besitzen neben den genannten Vorteilen auch folgende Schwäche: Zur erfolgreichen Separation des Raman-Signals vom fluoreszenten Untergrund muss es ansatzweise detektierbar sein [67]. Wird das Raman-Licht komplett von der Fluoreszenz verdeckt, so lässt sich auch mit den aufgelisteten Methoden keine Verbesserung erzielen.

Schnelles Gating

Eine weitere Methode zur Trennung des Raman-Signals vom störenden Fluoreszenzlicht beruht auf dem unterschiedlichen temporalen Verhalten der Fluoreszenz im Vergleich zur spontanen Raman-Streuung und wird als Time-Gated-Raman-Spektroskopie bezeichnet. Die Fluoreszenz hat je nach Umgebung des Fluorophors eine Lebensdauer im Bereich von 10^{-7} - 10^{-9} s [68], während die Raman-Streuung eine Lebensdauer im Bereich von nur 10^{-13} - 10^{-15} s besitzt [36]. Infolgedessen liegt die Emission des Fluoreszenz-Signals auf der Zeitskala zwischen 10 ps bis zu 100 ns [64]. Die Raman-Antwort hingegen erfolgt deutlich schneller (im Bereich von Subpicosekunden und wenigen Picosekunden nach der Anregung). Somit ist die zeitliche Trennung vom Fluoreszenz- und Raman-Signal möglich [69]. Für die Time-Gated-Raman-Spektroskopie benötigt man hochenergetische gepulste Laserquellen und schnelle optische Shutter (3-10 ps), die durch ein auf der Kerr-Zelle basiertes Kerr-Gate (engl. *Kerr-Tor*) oder eine Streak-Kamera realisierbar sind [70].

Das Raman-Signal wird ausschließlich während der Pulsdauer gesammelt und das nachfolgende Fluoreszenzlicht wird entweder durch das Kerr-Gate blockiert oder von der Streak-Kamera nicht mehr aufgenommen. Daraus folgt, dass diese Methode zur Eliminierung des fluoreszenten Untergrunds nicht anwendbar ist, wenn die Fluoreszenz-Lebensdauer mit der Dauer des Laserpulses vergleichbar ist.

Alternative Raman-basierte Techniken

Es gibt eine Reihe von Abwandlungen der spontanen Raman-Spektroskopie, die zur signifikanten Verstärkung des Raman-Signals führen und dadurch die Fluoreszenz deutlich minimieren oder sogar vermeiden. Die verbreitetsten Grundmechanismen lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen unterteilen:

- *Kohärente Prozesse*. Wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, lässt sich eine deutliche Signalverstärkung durch die Ausnutzung der kohärenten Raman-Streuung erreichen [71]. Im Fall der bildgebenden kohärenten Anti-Stokes Raman-Streuung lässt sich die Fluoreszenz größtenteils vermeiden, weil die Emission der Fluoreszenz immer auf der Stokes-Seite der anregenden Strahlung auftritt (vgl. Abb. 6). Infolge der Absorption eines Photons findet die Anregung

des betroffenen Moleküls in den ersten elektronischen Zustand statt. Daraufhin relaxiert es in den Schwingungszustand des angeregten elektronischen Niveaus und verliert dadurch Energie. Anschließend kehrt das Molekül in den elektronischen Grundzustand unter Ausstrahlung eines energieärmeren Photons zurück. Das CARS-Signal dagegen wird auf der Anti-Stokes-Seite hinsichtlich der Anregung detektiert (vgl. Abb. 4b). Darüber hinaus wird in CARS meistens nur eine einzelne Resonanz untersucht und nicht ein komplettes Spektrum, wie es bei der spontanen Raman-Spektroskopie der Fall ist. Dementsprechend lässt sich durch den Einsatz von schmalbandigen Filtern das Fluoreszenzlicht größtenteils unterdrücken.

- *Ausnutzung der lokalen Feldüberhöhung der einfallenden elektromagnetischen Strahlung in Kombination mit metallischen Oberflächen.* Eine weitere Möglichkeit, das Verhältnis des Raman-Signals zu Fluoreszenz signifikant zu verbessern, beruht auf der gezielten optischen Anregung der kollektiven Plasmonenschwingungen in metallischen Strukturen (z. B. Nanopartikeln) [72]. Ihrerseits führen diese Oszillationen zur lokalen Verstärkung des eingestrahlten elektromagnetischen Feldes. Befindet sich ein Analytmolekül in direkter Umgebung oder ist adsorbiert auf der metallischen Oberfläche, so wird sein Raman-Signal aufgrund der hervorgerufenen Feldüberhöhung verstärkt [22]. In einzelnen Systemen lassen sich Verstärkungsfaktoren bis zu von 10^{14} erzielen [23], [24]. Diese spektroskopische Methode ist unter dem Namen der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (engl. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS*) bekannt. Diese Methode wurde zur Probencharakterisierung in Kapitel 4.4 verwendet und dort genauer beschrieben.

Mathematische Methoden auf der Basis der Polynom Anpassung

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten instrumentellen Methoden zur Vermeidung der Fluoreszenz bedürfen die mathematischen Nachbearbeitungsalgorithmen keiner Modifizierungen des Aufbaus und werden in der Regel nach der Aufnahme der Raman-Daten angewandt [73].

Zu den einfachsten Techniken gehört eine Kurvenanpassung, die auf der Annäherung des Fluoreszenzuntergrundes durch eine Polynomfunktion und ihrer anschließenden Subtraktion vom ursprünglichen Raman-Spektrum beruht [74]. Das Endergebnis hängt dabei stark von den durch den Nutzer vorgegebenen Anfangsparametern ab. Lieber et al. haben deshalb einen automatisierten Algorithmus entwickelt, der die Parameter eigenständig anpasst und nur eine minimale Intervention des Anwenders erfordert [75]. Der sogenannte Lieber-Algorithmus wird in Kapitel 3.4.1 genauer vorgestellt.

Die mathematischen Methoden zur Eliminierung der Fluoreszenz sind oft zeitaufwendig und weisen eine starke Abhängigkeit von der Wahl der durch den Nutzer gesetzten

Parameter auf [77]. Darüber hinaus können die Nachbearbeitungsalgorithmen auch Artefakte in den stark verrauschten Raman-Daten verursachen [74].

2.3 Der harmonische Oszillator als Modell für die Schwingung eines zweiatomigen Moleküls

Moleküle bestehen aus zwei oder mehreren Atomen (s. Kap. 2.2.2), die über chemische Bindungen elastisch miteinander verbunden sind und dementsprechend Schwingungen mit einer geringen Amplitude um die Gleichgewichtslage q_0 ausführen können (s. Abb. 10).

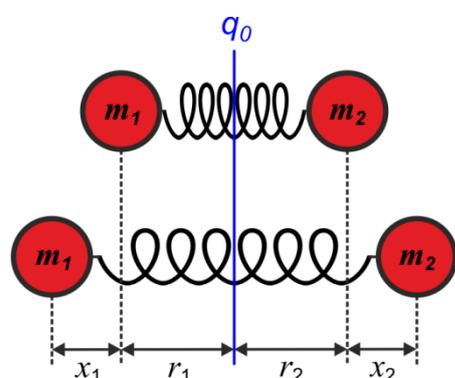


Abb. 10: Schematische Darstellung der Streckschwingung eines zweiatomigen Moleküls mit den Atommassen m_1 und m_2 . Als r_1 und r_2 werden die Abstände zwischen der Gleichgewichtslage q_0 und dem Schwerpunkt des jeweiligen Moleküls in der Ruhelage bezeichnet. x_1 und x_2 sind die dazugehörigen Auslenkungen aus der Gleichgewichtslage.

Wird der Gleichgewichtsabstand q_0 unterschritten bzw. überschritten, so sorgt die rücktreibende Kraft F für eine Abstoßung bzw. Anziehung der Atome. Dieser Zusammenhang lässt sich näherungsweise mit dem Hooke'schen Gesetz beschreiben:

$$F = -\kappa \cdot (x_1 + x_2) \quad (2.6)$$

Dabei ist κ die Federkonstante und x_1 bzw. x_2 beschreiben die Auslenkungen aus der Gleichgewichtslage. Die Federkonstante entspricht der Stärke einer chemischen Bindung zwischen den Atomen. Das negative Vorzeichen zeigt an, dass die Rückstellkraft F und die Auslenkung aus der Gleichgewichtslage $x_1 + x_2$ entgegengesetzt gerichtet sind.

Durch Umformung ergibt sich aus (2.6) die Schwingungsfrequenz ν :

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} \quad (2.7)$$

wobei $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ die reduzierte Masse der beiden Atommassen m_1 und m_2 ist.

Die Federkonstante κ hängt vor allem vom vorliegenden Bindungstyp ab: Einfachbindungen weisen zum Beispiel eine niedrigere Kraftkonstante als Doppel- oder Dreifachbindungen auf. Die typischen Kraftkonstanten für Einfachbindungen liegen zwischen 300 N/m und 1600 N/m, für Doppelbindungen zwischen 1000 N/m und 1200 N/m, für Dreifachbindungen zwischen 1500 N/m und 1800 N/m [28].

Je höher die Kraftkonstante und damit je stärker die chemische Bindung ist, desto höher ist die dazugehörige Schwingungsfrequenz. Beispielsweise lässt sich die stark gebundene Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindung bei 2200 cm^{-1} finden, während die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung bei 1640 cm^{-1} und Kohlenstoff-Einfachbindung bei 1000 cm^{-1} liegen [6].

Aus Gl. 2.7 folgt ebenfalls, dass schwere Atome mit niedrigeren Frequenzen und leichte Atome mit höheren Frequenzen schwingen. Zum Beispiel lässt sich die C-Cl-Bindung (Atommasse: 47u) bei 700 cm^{-1} finden, während sich die C-H-Bindung (Atommasse: 13u) bei 3000 cm^{-1} befindet [78].

Das oben vorgestellte Schwingungsmodell weist einen linearen Zusammenhang zwischen der Auslenkung aus der Gleichgewichtslage und der dagegenwirkenden Rückstellkraft auf. Das sich daraus ergebene Potenzial verhält sich quadratisch zur Auslenkung mit einem Potenzialminimum in der Gleichgewichtsposition. Dieses Modellsystem wird als harmonischer Oszillator bezeichnet. Die dazugehörige Potenzialkurve hat die Form einer Parabel, deren Minimum der Gleichgewichtsabstand ist.

Das klassische Modell des harmonischen Oszillators kann auf Quantensysteme erweitert werden, indem Orts- und Impulsoperatoren eingeführt werden. Die potentielle Energie einer quantenmechanischen harmonischen Schwingung ergibt sich zu

$$V = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot h\nu_0 = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot \hbar\omega \quad (2.8)$$

wobei ν die Schwingungsquantenzahl, $h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ die Planck-Konstante, ν_0 die Schwingungsfrequenz, ω die Kreisfrequenz und $\hbar = h/2\pi$ die reduzierte Planck-Konstante ist.

Entsprechend der Gl. 2.8 können die resultierenden Energiezustände nicht mehr beliebige Werte annehmen, d. h. es kommt zu einer Quantisierung der Schwingungszustände von Molekülen. Die Abstände zwischen den einzelnen Energieniveaus sind äquidistant und

betragen $\Delta V = h\nu = \hbar\omega$ (s. Abb. 11). Die Auswahlregel für die Übergangswahrscheinlichkeit lautet $\Delta\nu = \pm 1$. Im Vergleich zum klassischen harmonischen Oszillator existiert im quantenmechanischen Oszillator außerdem die Nullpunktsenergie, weil die Position des Teilchens bei q_0 im Potenzial aufgrund der Heisenberg'schen Unschärferelation nicht exakt bestimmbar ist. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Massen m_1 und m_2 gegenüber der q_0 -Position ergibt sich aus dem Betragsquadrat der zugehörigen Wellenfunktion.

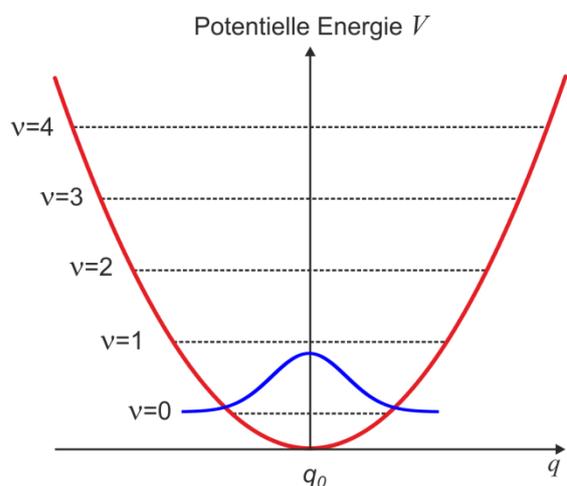


Abb. 11: Schematische Darstellung der Potenzialkurve eines quantenmechanischen harmonischen Oszillators mit den diskreten Energieniveaus $\nu = 0, 1, \dots$. Dabei ist die potentielle Energie V gegen den Kernabstand q aufgetragen. In blau ist eine exemplarische Aufenthaltswahrscheinlichkeit des betrachteten Teilchens für $\nu = 0$ dargestellt. Als q_0 wird die Gleichgewichtslage des schwingenden Systems bezeichnet.

Das Modell des harmonischen Oszillators ist eine gute Näherung für kleine Auslenkungen um den Ruheabstand in einem Potenzialminimum. Sobald die Auslenkung größer wird, lässt sich dieses Modell nicht mehr anwenden, da die Moleküle in Wirklichkeit keine streng harmonischen Schwingungen ausführen. Bei größeren Schwingungsamplituden ist die Dissoziation des betroffenen Moleküls zu erwarten, die zum flachen Anstieg der Potenzialkurve in diesem Bereich führt (s. Abb. 12, blaue Kurve). Bei den Auslenkungen, die betragsmäßig kleiner als der Gleichgewichtsabstand sind, erwartet man hingegen Abstoßungskräfte, die sich in einem steileren Verlauf der Potenzialkurve im Vergleich zur Potenzialkurve des harmonischen Oszillators äußern (s. Abb. 12, rote Kurve). Demzufolge lässt sich die Potenzialkurve nicht mehr durch eine Parabel, sondern durch die sogenannte Morse-Kurve beschreiben. Diese folgt der Gleichung

$$V = D_e(1 - e^{-\alpha q})^2 \quad (2.9)$$

Dabei ist D_e die Dissoziationsenergie, α die molekulspezifische Konstante, die die Krümmung der Potenzialkurve angibt, und q der Kernabstand.

Die Abstände zwischen den einzelnen Energieniveaus sind nicht mehr äquidistant und rücken mit steigenden Schwingungsquantenzahlen immer näher zusammen, bis bei größeren Kernabständen ein Plateau erreicht wird. Der Abstand zwischen diesem Plateau

und dem Minimum der Potenzialkurve entspricht der Dissoziationsenergie des betroffenen Moleküls D_e . Die Dissoziationsenergie gibt die Energie an, die zur Spaltung der Bindung zwischen den beiden Atomen eines zweiatomigen Moleküls benötigt wird. Oberhalb dieser Energie gibt es keine quantisierten Energieniveaus mehr, sondern ein Energiekontinuum.

Im anharmonischen Morse-Potenzial lautet die Auswahlregel für die Übergangswahrscheinlichkeit für vibronische Zustände nicht mehr ausschließlich $\Delta v = \pm 1$, wie es beim harmonischen Potenzial der Fall ist: Es sind auch weitere Übergänge $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$ möglich. Das heißt, dass im Morse-Potenzial zusätzlich zu Grundschrwingungen ($\Delta v = \pm 1$) auch Oberton- und Kombinationsschwingungen (Kopplung von Schwingungen sowohl gleicher als auch unterschiedlicher Frequenzen) beobachtet werden, die für das Auftreten zusätzlicher Linien im Spektrum verantwortlich sind. Die Obertonschwingungen sind allerdings deutlich weniger ausgeprägt als Grundschrwingungen [79].

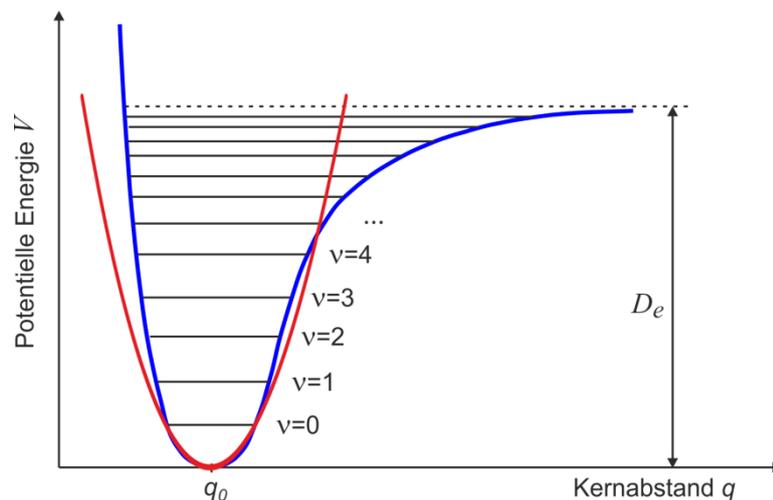


Abb. 12: Schematische Darstellung des Morse-Potenzials für anharmonische Schwingungen mit Energieniveaus $v = 0, 1, \dots, n$ (blau). In rot ist zum Vergleich ein quadratisches Potenzial dargestellt. Mit steigenden Schwingungsquantenzahlen werden die Abstände zwischen den einzelnen Niveaus immer kleiner, bis das betroffene Molekül die Dissoziationsenergie D_e erreicht hat. Mit q_0 wird die Schwingungsgleichgewichtslage bezeichnet.

In einem zweiatomigen Molekül ist nur eine einzige Grundschrwingung entlang der Bindungsachse der beiden Atome möglich. In vielatomigen Molekülen dagegen liegen mehrere Atome mit unterschiedlichen Bindungen vor, wodurch weitere Schwingungszustände zustande kommen. Zu den wichtigsten Schwingungen gehören Deformations- und Streckschwingungen.

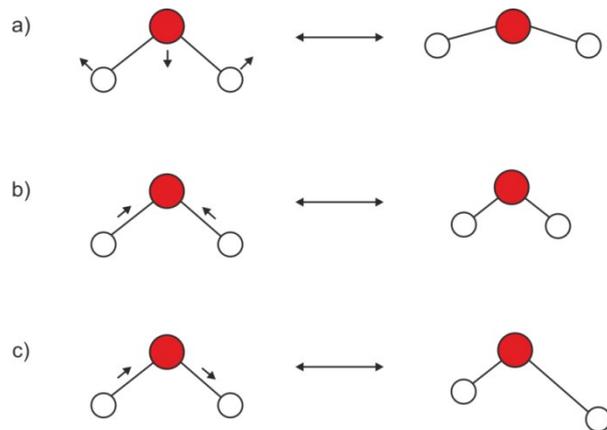


Abb. 13: Schematische Darstellung der Schwingungen des Wassermoleküls: a) Deformationsschwingung, b) symmetrische Streckschwingung, c) asymmetrische Streckschwingung.

Bei Deformationsschwingungen ändern sich die Bindungswinkel im Molekül, während die Bindungslängen annähernd konstant bleiben (s. Abb. 13a). In Abhängigkeit davon, ob die Schwingungen in oder außerhalb der Ebene stattfinden, ist eine weitere Unterteilung der Deformationsschwingungen in Schaukel-, Scher-, Dreh- und Wippschwingungen möglich. Im Fall von Streckschwingungen (s. Abb. 13b, c), die auch als Valenzschwingungen bezeichnet werden, kommt es zur Änderung der Bindungslänge. Bei Streckschwingungen unterscheidet man zwischen symmetrischen (s. Abb. 13b) und asymmetrischen Schwingungen (s. Abb. 13c).

Die Anzahl der möglichen Streckschwingungen entspricht der Zahl der in einem Molekül vorhandenen Bindungen. Die Anzahl der Deformationsschwingungen hingegen ergibt sich aus der Differenz aller möglichen Schwingungsmoden und der Streckschwingungen. Die Anzahl der möglichen Schwingungsmoden lässt sich zu $3N-6$ für nicht-lineare Moleküle und $3N-5$ für lineare Moleküle bestimmen, wobei bei letzteren keine Rotation um die molekulare Achse möglich ist. Dementsprechend ergibt sich die Gesamtanzahl der Freiheitsgrade aus 3 Translationsfreiheitsgraden, 3 (in nicht-linearen Molekülen) bzw. 2 (in linearen Molekülen) Rotationsfreiheitsgraden. Die restlichen Freiheitsgrade entfallen auf die Vibration. Allerdings sind nicht alle Vibrationsschwingungen Ramanaktiv, sondern nur diejenigen, die den Auswahlregeln genügen. Diese werden in Kapitel 2.4 vorgestellt.

In einem dreiatomigen nicht-linearen Molekül, wie Wasser, gibt es $3N-6=3$ mögliche Schwingungsmoden, die in Abbildung 13 gezeigt werden. Aufgrund der zwei O-H-Bindungen lässt sich die Anzahl der potentiellen Streckschwingungen zu 2 bestimmen (s. Abb. 13b, c), d. h. eine Schwingung entfällt auf die Deformation (s. Abb. 13a).

Da mehr Energie zur Auseinanderstreckung einer Bindung als zu ihrer Deformation benötigt wird und aufgrund der Proportionalität der Vibrationsfrequenz und der Dissoziationsenergie, befinden sich Streckschwingungen bei höheren Wellenzahlen

gegenüber den korrespondierenden Deformationsschwingungen. Beispielsweise liegen die O-H-Streckschwingungen eines Wassermoleküls im Bereich zwischen 3600 cm^{-1} und 3800 cm^{-1} , während die O-H-Deformationsmode bei 1595 cm^{-1} detektiert wird [80]. Da asymmetrische Streckschwingungen weniger Energie zur Schwingungsanregung erfordern, befinden sie sich bei höheren Wellenzahlen als symmetrische Vibrationen. Die asymmetrische O-H-Streckschwingung eines Wassermoleküls liegt bei 3756 cm^{-1} und die symmetrische O-H-Schwingung bei 3652 cm^{-1} [80].

2.4 Beschreibung der Raman-Streuung mit Hilfe der Polarisierbarkeit eines Moleküls

Die Wechselwirkung von elektromagnetischen Wellen mit Materie ruft eine Verschiebung der negativ geladenen Elektronenwolke gegenüber den positiv geladenen Molekülrümpfen hervor und induziert so ein Dipolmoment, das mit der Anregungsfrequenz der Lichtquelle schwingt. Da jede molekulare Substanz noch zusätzliche molekülspezifische Eigenschwingungen ausführt, lassen sich auch weitere Frequenzen beobachten, die von der Anregungsstrahlung unabhängig sind.

Das induzierte Dipolmoment μ_{ind} wird als Produkt aus Polarisierbarkeit α und elektrischer Feldstärke \mathbf{E} beschrieben [6]:

$$\mu_{ind} = \alpha \mathbf{E} \quad (2.10)$$

wobei α ein Tensor zweiter Stufe, μ_{ind} und \mathbf{E} Vektoren sind. Die Polarisierbarkeit gilt dabei als Maß für die Verschiebbarkeit der Elektronenwolke gegenüber den Kernen.

Zur Vereinfachung wird hier nur der eindimensionale Fall entlang der Polarisation des anregenden Lichtfeldes betrachtet. Setzt man für das periodisch oszillierende elektrische Feld den Ausdruck $E = E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_0 t)$ ein, so ergibt sich unter Berücksichtigung der Gleichung 2.10 für das induzierte Dipolmoment:

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.11)$$

E_0 ist dabei die Vibrationsamplitude und ν_0 die Anregungsfrequenz des Lasers.

Für kleine Auslenkungen q aus der Gleichgewichtslage q_0 ist die Polarisierbarkeit α linear zur Auslenkung. Aufgrund dessen lässt sich eine Taylorentwicklung durchführen:

$$\alpha(q) = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right)q + O\left(\left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right)^2\right) \quad (2.12)$$

Die Auslenkung selbst kann als

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_R t) \quad (2.13)$$

geschrieben werden, wobei q_0 die Gleichgewichtslage und ν_R die Schwingungsfrequenz des Moleküls sind.

Das Einsetzen von Gl. 2.12 und Gl. 2.13 in Gl. 2.11 liefert:

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_R t) = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right) q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_R t) \quad (2.14)$$

Der Ausdruck $\alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ beschreibt in Gl. 2.14 die Rayleigh-Streuung, bei der sich die Frequenz der rückgestreuten Photonen nicht ändert.

Mit $\cos(\alpha)\cos(\beta) = \frac{[\cos(\alpha+\beta)+\cos(\alpha-\beta)]}{2}$ lässt sich die Gl. 2.14 zu

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right) q_0 E_0 \frac{\cos(2\pi(\nu_0 + \nu_R)t) + \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_R)t)}{2} \quad (2.15)$$

vereinfachen. Der letzte Term lässt sich der Raman-Streuung zuordnen: Der Ausdruck $(\nu_0 + \nu_R)$ beschreibt die Anti-Stokes-Raman-Streuung und $(\nu_0 - \nu_R)$ die Stokes-Raman-Streuung. Laut Gleichung 2.15 sind die beiden Beiträge identisch und führen folglich zu den gleichen Intensitäten für die Stokes- und Anti-Stokes-Streuung. In der Realität ist dies aber nicht der Fall, denn die Besetzungswahrscheinlichkeit der Schwingungsniveaus folgt der Maxwell-Boltzmann-Verteilung und ist aufgrund dessen in hohem Maße temperaturabhängig (vgl. Gl. 2.1).

Der letzte Ausdruck in der Gleichung 2.15 wird Null, wenn sich die Polarisierbarkeit mit dem Abstand der Kerne im Molekül nicht ändert: Es würde also eine nicht Raman-aktive Schwingung vorliegen. Demzufolge können die Raman-aktiven Schwingungen nur dann auftreten, wenn die Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingung oszilliert, d. h. $(\delta\alpha/\delta q_0) \neq 0$. Des Weiteren ist die Intensität des Raman-Signals proportional zum Quadrat der Änderung der Polarisierbarkeit: $I_R \propto (\delta\alpha/\delta q_0)^2$. Zusätzlich gilt folgende

Auswahlregel: Bei einem Molekül mit einem Symmetriezentrum sind alle Schwingungen, die antisymmetrisch zum Symmetriezentrum sind, im Raman-Spektrum verboten [6].

3 Experimentelle und mathematische Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten experimentellen und mathematischen Methoden vorgestellt. Zu Beginn wird in Kapitel 3.1 das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Raman-Spektrometer beschrieben und charakterisiert. Dieses zeichnet sich unter anderem durch eine große Anzahl an Anregungswellenlängen aus. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die Raman-Spektroskopie mit der Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie zu kombinieren. Dadurch eröffnet sich eine Vielzahl von Messmöglichkeiten, die an ausgewählten Beispielen in Kapitel 3.2 gezeigt werden. In Kapitel 3.3 erfolgt eine Gegenüberstellung von unterschiedlichen Trägermaterialien, welche für Proben bei Raman-Messungen zur Anwendung kommen. Abschließend wird in Kapitel 3.4 auf die Funktionsweise der beiden in der Arbeit verwendeten mathematischen Auswertungsmethoden eingegangen. Der Lieber-Algorithmus wird zur Subtraktion des Hintergrundsignals von Roh-Raman-Spektren herangezogen (s. Kap. 3.4.1). Um auch noch Korrelationen in Raman-Spektren zu finden, die nicht direkt erkennbar sind und diese zu visualisieren, wird die Hauptkomponentenanalyse verwendet (s. Kap. 3.4.2).

3.1 Optomechanischer Aufbau zur spontanen Raman-Spektroskopie

Seit ca. 40 Jahren werden komplette Raman-Systeme von Herstellern, wie Horiba oder Witec, kommerziell angeboten und finden ihre Anwendung in verschiedensten Bereichen der Naturwissenschaften oder in der Industrie [81]–[88]. Infolge der Weiterentwicklung und Optimierung der einzelnen Komponenten sind seit einigen Jahren auch table-top Raman-Systeme erhältlich [89].

Trotz der offensichtlichen Vorteile, wie Benutzerfreundlichkeit, Implementierung von Hintergrundabzugsalgorithmen und automatisierter Justage, sind die kommerziellen Raman-Systeme unflexibel bei Änderungen der Messanforderungen. Für verschiedene Anwendungen werden beispielsweise unterschiedliche Wellenlängen benötigt. Die meisten Raman-Spektrometer verfügen nur über eine oder zwei Anregungslichtquellen und können nicht nach Bedarf erweitert werden. Darüber hinaus besitzen solche Systeme meist eine starre Messgeometrie, die nicht an die zu untersuchende Probe angepasst werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein flexibles Raman-System aufgebaut, das folgende Kriterien erfüllt:

- Es stehen verschiedene Anregungswellenlängen im Vis- und NIR-Bereich für die Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie zur Verfügung. Das Hin- und Herschalten zwischen den einzelnen Wellenlängen erfolgt schnell und ohne großen Aufwand.
- Das aufgebaute Raman-Spektrometer verwendet ein konfokales Detektionsprinzip. Störendes Hintergrundsignal, das nicht aus dem Anregungsfokus stammt, gelangt dadurch nicht zum Detektor. Das aufgebaute Raman-System eignet sich dadurch für die Analyse kleiner Volumina bzw. dünner Filme.
- Zur Minimierung des Hintergrundsignals und zur Manipulation von kleinen Objekten, z. B. Zellen, ist das Raman-Spektrometer mit einer optischen Falle kombinierbar.
- Das System ermöglicht die Bildgebung durch Raster-Scanfunktion.
- Als weitere Charakterisierungsmethode und zur Orientierung auf der Probe besteht die Möglichkeit, die Oberfläche der zu untersuchenden Substanz mittels der klassischen Durchlichtmikroskopie hochauflösend abzubilden.

Im Folgenden wird das aufgebaute Raman-System mit seinen einzelnen Komponenten und deren Funktionsweise vorgestellt (s. Abb. 14).

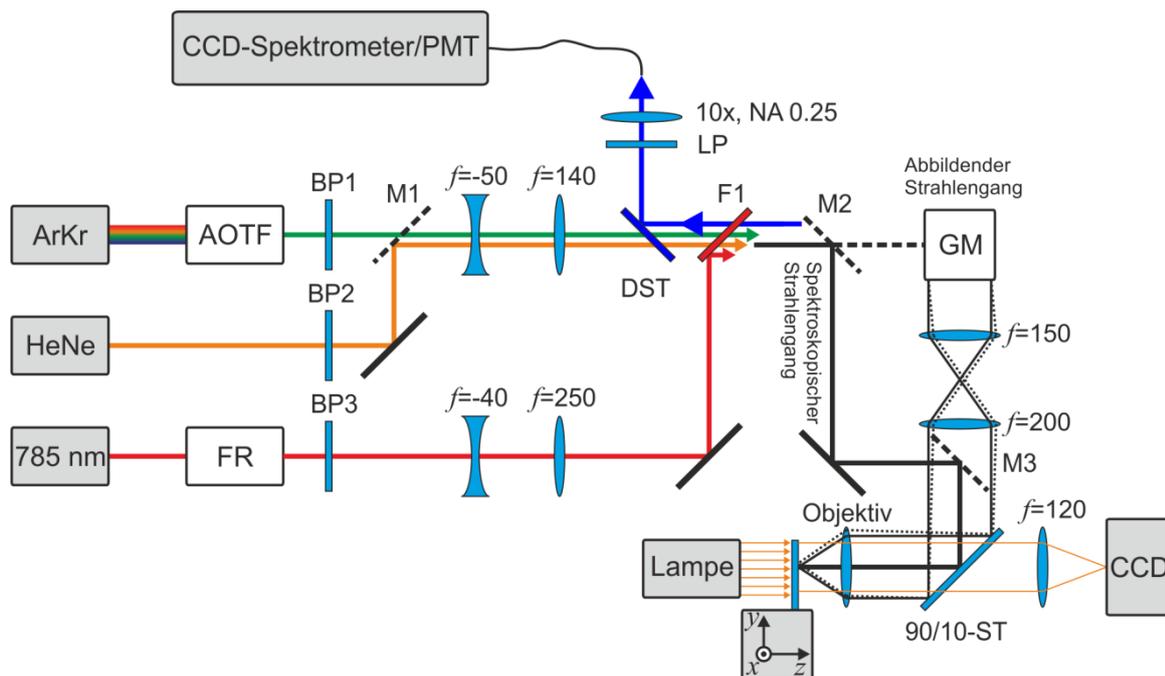


Abb. 14: Schematische Darstellung des aufgebauten Raman-Spektrometers. ArKr: Argon-Krypton-Ionenlaser; HeNe: Helium-Neon-Laser; 785 nm: Laserdiode; AOTF: akustooptischer durchstimmbare Filter. Die von den Lasern emittierte Strahlung ist mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. FR: Faraday-Rotator; BP1, BP2, BP3: Bandpassfilter, M1, M2 und M3: Klappspiegel; DST: dichroitischer Strahlteiler; F1: Notch-Strahlteiler; GM: galvanometrische Scan-Spiegel; ST: Strahlteiler; LP: Langpassfilter; PMT: Photomultiplier. Gemeinsame Strahlengänge der Anregungslaser sind in schwarz dargestellt. Das in Rückrichtung zu detektierende Fluoreszenz- bzw. Raman-Licht wird über den DST abgegriffen (blauer Strahlengang).

Als Lichtquelle werden drei verschiedene Laser mit schmalbandigen Emissionslinien verwendet: Helium-Neon-Laser (HeNe, 632.8 nm, Coherent, 9374 EF, s. Abb. 14, oranger Strahlengang), Argon-Krypton-Ionenlaser (ArKr, Innova 70C Spectrum, Coherent, s. Abb. 14, Strahlengang mit Farbverlauf) mit emittierten Wellenlängen im Vis-Bereich (488 nm, 514 nm, 520 nm, 532 nm, 568 nm und 647 nm) und Single-Mode-Diodenlaser (785 nm, Innovative Photonic Solutions, s. Abb. 14, roter Strahlengang). Dadurch wird das Raman-Spektrometer sehr flexibel hinsichtlich der Anregungswellenlänge im Vis- und NIR-Bereich.

Um den Laserstrahl von Nebenemissionen des Lasers zu bereinigen, werden schmalbandige Bandpassfilter (BP) direkt am Ausgang des jeweiligen Lasers verwendet, die je nach Zentralwellenlänge eine spektrale Breite von 2 nm bis 15 nm besitzen (s. Tab. 2).

Bezeichnung	Wellenlänge [nm]
Dual Line Clean-Up ZET 488/647	488
BrightLine HC 520/15	514
HC Laser Clean-Up MaxLine 568/2	568
HC Laser Clean-Up MaxLine 632,8/2.4	633
HC Laser Clean-Up MaxLine 647,1/2.5	647
HC Laser Clean-Up MaxLine 785/3	785

Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten Bandpassfilter.

Der HeNe- und der Diodenlaser emittieren jeweils nur eine Wellenlänge, während der ArKr-Ionenlaser eine Multilinenquelle im Vis-Bereich ist. Die gewünschte Wellenlänge des Lasers kann mittels eines akustooptischen durchstimmbaren Filters (AOTF, AOTFnc-VIS, AA Optoelectronics) im Bereich zwischen 450 nm und 700 nm ausgewählt werden (s. Abb. 14, AOTF). Dieses wellenlängenselektive Element ermöglicht ein schnelles Schalten zwischen verschiedenen Wellenlängen und eine Kontrolle der resultierenden Strahlintensität. Der Strahlengang des ArKr-Ionenlasers ist in Abbildung 14 nach dem AOTF in grün eingezeichnet.

Ein AOTF besteht im Wesentlichen aus einem anisotropen akustooptischen Kristall (hier: Tellurdioxid, TeO_2) und einem Radiofrequenzgenerator (s. Abb. 15). Durch Anlegen einer Radiofrequenz an den Piezokristall wird dieser in Schwingung versetzt und es entsteht eine akustische Welle. Diese propagiert durch den Kristall bis zum akustischen Absorber und erzeugt dabei aufgrund der Dichteschwankungen ein Brechungsindexgitter

im Kristall. Der akustische Absorber verhindert dabei das Auftreten von Reflexionen und stehenden Wellen. Beim Eintreten des Laserlichts in den akustooptischen Kristall wird der Strahl in zwei Teilstrahlen geteilt: den direkten (s. Abb. 15, 0. Ordnung, rot gestrichelt) und den gebeugten Strahl (s. Abb. 15, 1. Ordnung, rot durchgezogen). In Abhängigkeit von der eingestellten Radiofrequenz (hier: 80-153 MHz) ändert sich auch die Wellenlänge des Lichts, welches gebeugt wird. Dadurch lässt sich die gewünschte Wellenlänge aus einem aus mehreren Wellenlängen zusammengesetzten Spektrum des ArKr-Lasers herausfiltern. Darüber hinaus lässt sich mit dem AOTF durch die Anpassung der Schallwellenintensität auch die Laserleistung einer bestimmten Anregungswellenlänge einstellen.

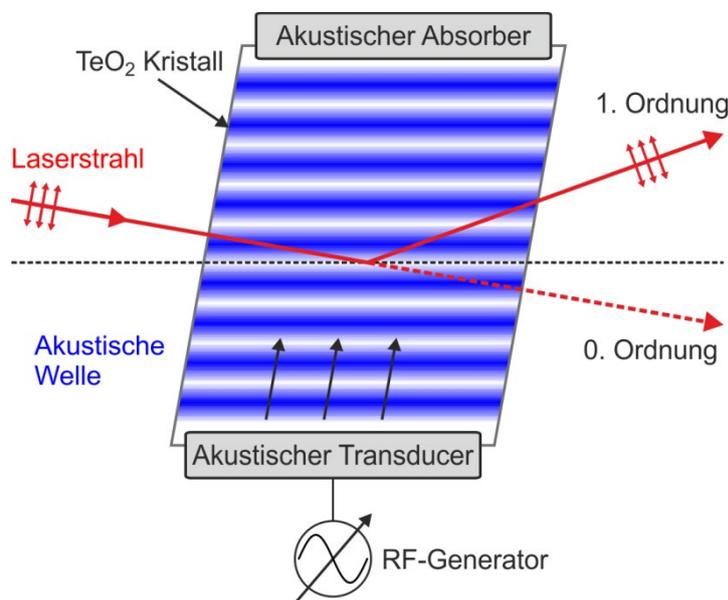


Abb. 15: Funktionsweise eines akustooptischen durchstimmbaren Filters. Die Einkopplung einer akustischen Welle (blau dargestellt) in den doppelbrechenden TeO₂-Kristall erfolgt über einen akustischen Transducer, an den mittels eines Radiofrequenzgenerators (RF-Generator) eine Radiofrequenz angelegt wird. Der einfallende Lichtstrahl wird bei der Wechselwirkung mit dem akustischen Beugungsgitter in einen ungebeugten (0. Ordnung, rot gestrichelt) und einen gebeugten (1. Ordnung, rot durchgezogen) Teilstrahl aufgeteilt.

In optischen Systemen treten Rückreflexionen in den Laserresonator auf, z. B. durch Teilreflexionen an Oberflächen von Linsen oder ähnlichem. Dabei kann es zur Ausbildung eines instabilen Resonators außerhalb des Lasers zwischen dessen Auskoppelspiegel und der zurückreflektierenden Optik im Strahlengang kommen. Ebenfalls kann das zurückreflektierte Licht zum Teil in den Laserresonator eindringen, wenn ein planarer Auskoppelspiegel eingesetzt wurde. Bei den beiden Gaslasern (HeNe und ArKr) führen solche Rückreflexe zu Frequenzinstabilitäten und Rauschen. Bei einem Diodenlaser können sie darüber hinaus eine Schädigung oder sogar Zerstörung des verwendeten Halbleiters und damit des Lasers hervorrufen. Um störende optische

Rückreflexe fernzuhalten, wird vor dem Diodenlaser ein Faraday-Rotator (IO-5-NIR, 700-950 nm, Optics for Research, Caldwell) eingesetzt.

Der optische Isolator besteht aus zwei linear Polarisatoren, die um 45° gegeneinander verdreht sind (s. Abb. 16). Dazwischen befindet sich der eigentliche Faraday-Rotator, der eine Kombination von einem magnetooptischen Kristall (hier: Terbium-Gallium-Granat-Kristall) und einem Dauermagneten ist. Das Laserlicht wird am Eingangspolarisator linear polarisiert. Die Polarisation wird im Faraday-Rotator um 45° gedreht und anschließend kann das Licht den Endpolarisator ungestört verlassen. Kommt das Licht aus der entgegengesetzten Richtung, so wird es ebenfalls am Ausgangspolarisator linear polarisiert. Daraufhin wird die Polarisation im Faraday-Rotator wiederum um 45° in die gleiche Richtung gedreht. Das Licht, das den Faraday-Rotator verlassen hat, steht nun senkrecht zum Eingangspolarisator und wird von diesem blockiert. Somit können Rückreflexionen in den Diodenlaser durch die Verwendung eines optischen Isolators verhindert werden.

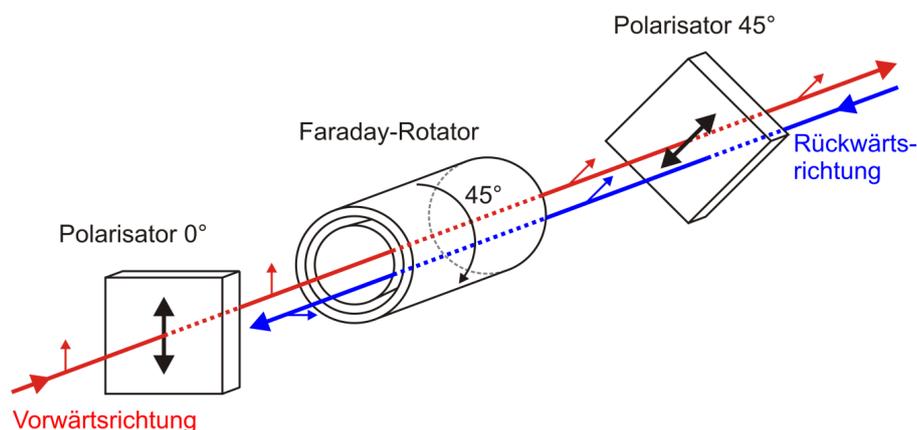


Abb. 16: Funktionsweise eines optischen Isolators, der aus einem Faraday-Rotator und zwei Polarisatoren besteht. Der Faraday-Rotator stellt einen magnetooptischen Kristall dar (innerer Zylinder), der von einem Dauermagneten (äußerer Zylinder) ummantelt ist. In Vorwärtsrichtung (roter Strahlengang): Das einfallende Laserlicht wird am Eingangspolarisator (Polarisator 0°) linear polarisiert. Das nun polarisierte Licht wird im Faraday-Rotator um 45° gedreht. Daraufhin kann es den Endpolarisator (Polarisator 45°) ungestört verlassen. In Rückwärtsrichtung (blauer Strahlengang): Die Polarisation des rückwärtig eintretenden Lichts wird beim Passieren des Austrittspolarisators (Polarisator 45°) um 45° und nach dem Durchlauf des Faraday-Rotators um weitere 45° gedreht. Infolgedessen wird der Strahl mit der insgesamt um 90° gedrehten Polarisation vom Eintrittspolarisator (Polarisator 0°) blockiert.

Da alle Laserstrahlen über vergleichsweise längere Strecken geführt werden müssen, muss die damit verbundene Strahldivergenz vermieden werden. Darüber hinaus muss auch die Eingangsapertur des Objektivs durch den Laserstrahl möglichst komplett ausgeleuchtet werden, um bei der Verwendung von hochnumerischen Objektiven eine gute Fokussierung zu erreichen. Für eine optimale Erhöhung der Leistungsdichte im Fokuspunkt muss ein kleiner Strahlradius im Fokus w_{Fokus} erreicht werden. Es gilt der

folgende Zusammenhang zum Radius des einfallenden Strahls w_0 : $w_{Fokus} \propto 1/w_0$ [90]. Die Durchmesser der Eingangsapertur der benutzten Objektive (s. Tab. 3) betragen 8 mm.

Der Laserstrahldurchmesser des HeNe-Lasers beträgt 1.2 mm, des ArKr-Lasers 1.5 mm und des Diodenlasers 0.7 mm. Infolgedessen wurde immer eine entsprechende aufweitende Optik im Strahlengang eingesetzt, um den Durchmesser des beleuchtenden Laserstrahls zu vergrößern und die Apertur auszuleuchten. Die dafür verwendeten Teleskope werden im Folgenden beschrieben.

Ein Teleskop besteht aus zwei Linsen, deren Abstand die Summe der Brennweiten der beiden Linsen ist. Da der Aufbau möglichst kompakt sein soll, wurden für die verwendeten Teleskope eine Sammellinse und eine Zerstreuungslinse ausgewählt (s. Abb. 14). Das Teleskop im Strahlengang des Diodenlasers weitet den Strahl um einen Faktor 6.25 zu 4.4 mm auf. Das zweite 2.8-fache Teleskop befindet sich im Strahlengang für den HeNe- und ArKr-Laser. Damit sind ihre Strahldurchmesser nach dem Passieren des Teleskops 3.4 mm (HeNe) und 4.2 mm (ArKr).

Da die beiden Strahlen bei Raster-Messungen über die galvanometrischen Scan-Spiegel (GM) propagieren (s. Abb. 14), können die Strahldurchmesser nicht weiter aufgeweitet werden, denn die Größe der Spiegel beträgt 5 mm. Eine größere Ausleuchtung der Spiegel würde zum Abschneiden des Raman-Signals und damit zu einer Verringerung dessen Intensität führen. Aus diesem Grund wurden keine weitere Strahlaufweitung als die oben genannte eingesetzt.

In Abbildung 17 sind die unterschiedlichen Strahlengänge über einem Bild des Aufbaus eingezeichnet. Es ergeben sich zwei Strahlengänge für drei verschiedene Laser: Der HeNe-Laser (nicht im Bild gezeigt) und ArKr-Laser (grüne Linien) verlaufen nach dem AOTF kollinear in einem Strahlengang (grüner Strahlengang). Der Diodenlaser hat einen separaten Strahlengang (roter Strahlengang), da für den NIR-Bereich Linsen mit einer speziellen Beschichtung verwendet werden müssen. Im Unterschied zu Abbildung 14 ist der HeNe-Laser nicht im Bild des Aufbaus vorhanden, da er zu diesem Zeitpunkt nicht benötigt wurde.

Die beiden Strahlengänge der Anregungslaser (s. Abb. 17, roter und grüner Strahlengänge) werden am Notch-Strahlteiler (F1) (Notch-Strahlteiler 785 nm, Semrock) zusammengeführt. Ab diesem unterscheidet man zwischen dem spektroskopischen und dem abbildenden Strahlengang, die im Folgenden beschrieben werden. Vor dem Notch-Strahlteiler werden dielektrische Spiegel für die beiden Wellenlängenbereiche (E02: 400-750 nm, E03: 750-1100 nm) verwendet. Ab dem Notch-Strahlteiler werden ausschließlich Silberspiegel benutzt, da sie eine Reflektivität von mehr als 98% sowohl im Vis- als auch im NIR-Bereich aufweisen und sich dementsprechend für alle verwendeten Wellenlängen eignen.

Beide Strahlengänge führen zum Objektiv, welches das Laserlicht auf die Probe fokussiert. Die Probe ist dabei auf einem x - y -Piezo-Verschiebetisch (PZT, E-501.00,

Physik Instrumente) angebracht (s. Abb. 17, roter Kreis). Es besteht auch die Möglichkeit, die Probe mit Hilfe von Mikrometerschrauben manuell lateral zu verschieben. Die axiale Positionierung erfolgt ebenfalls über eine Mikrometerschraube oder über einen Piezo-Objektivring (PI. WSP-721.10, Physik Instrumente), wobei die Fokalebene durch eine axiale Verschiebung des Objektivs eingestellt wird.

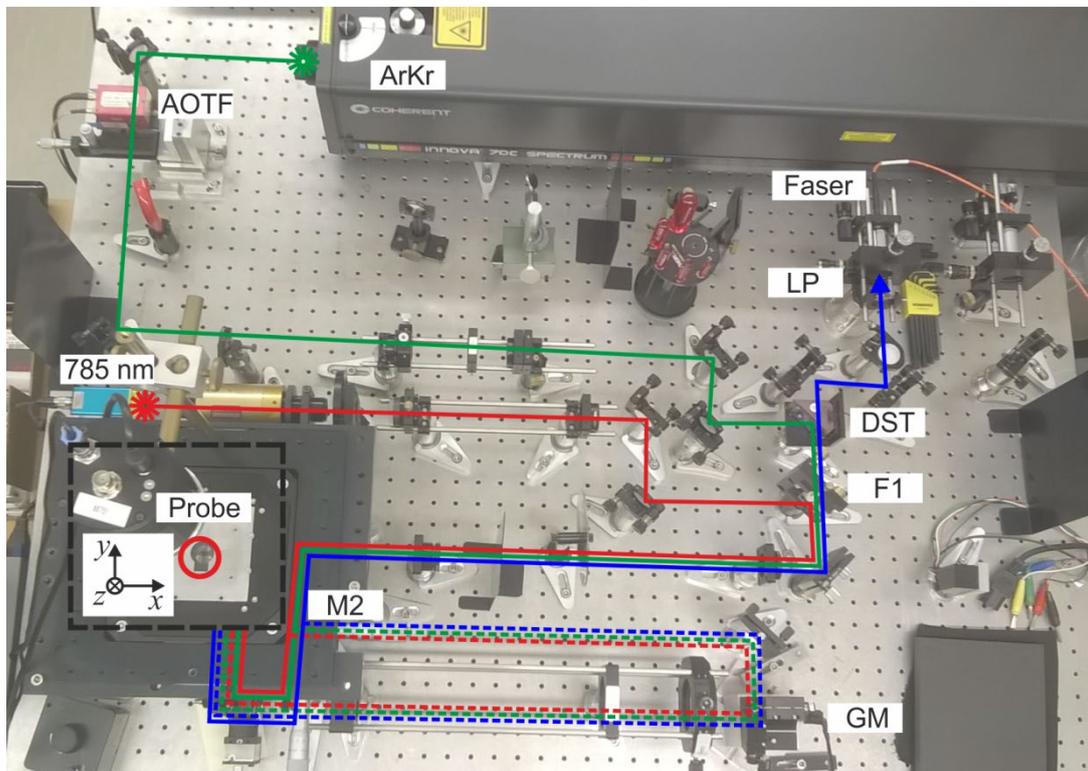


Abb. 17: Foto des aufgebauten Raman-Spektrometers mit eingezeichneten Strahlengängen und ausgewählten optischen Komponenten. ArKr: Argon-Krypton-Ionenlaser; 785 nm: Laserdiode; AOTF: akustooptischer durchstimmbare Filter; M2 Klappspiegel; DST: dichroitischer Strahlteiler; F1: Notch-Strahlteiler; GM: galvanometrische Scan-Spiegel; LP: Langpassfilter. Der spektroskopische Strahlengang (durchgezogene Linien) wird zur Aufnahme von punktuellen Raman-Spektren benutzt: ArKr-Strahl (grüne durchgezogene Linie) und 785 nm-Strahl (rote durchgezogene Linie). Der zu detektierende Strahl ist als blaue durchgezogene Linie eingezeichnet und für alle verwendeten Anregungslichtquellen identisch. Der abbildende Strahlengang (gestrichelte Linien) wird hauptsächlich zum Abrastern der zu analysierenden Probe verwendet. Der zu detektierende Strahl ist dabei als blaue gestrichelte Linie vom Objektiv bis zum Spiegel M2 gezeichnet. Mit dem roten Kreis ist die Position der zu untersuchenden Probe direkt oberhalb des Objektivs markiert.

Über dem Proben Tisch befindet sich eine LED-Beleuchtungseinheit, die in Kombination mit einem 90/10-Strahlteiler (s. Abb. 14) und einer mit einem CMOS-Sensor ausgestatteten μ Eye-Kamera (IDS, UI-1240-SE-M-GL, 1280x1024 Pixel) Durchlichtaufnahmen der Probenoberfläche ermöglicht.

Der spektroskopische Strahlengang:

Dieser Strahlengang (s. Abb. 17, rote und grüne durchgezogene Linien) führt den Anregungslaserstrahl über Umlenkspiegel direkt zum Objektiv, welches das Licht auf die zu untersuchende Probe (s. Abb. 17, roter Kreis) fokussiert. Das zu detektierende Licht wird mittels einer Multimode-Faser zum Spektrometer und der CCD-Kamera geführt (s. Abb. 17, blaue durchgezogene Linie). Diese Detektionseinheit wird im Verlauf dieses Kapitels eingehend charakterisiert. Der spektroskopische Strahlengang wird nur für die Aufnahme von Raman- oder Fluoreszenz-Spektren verwendet.

Der abbildende Strahlengang:

Durch den piezogesteuerten Verschiebetisch ist es möglich, die Probe horizontal in Bezug auf die Strahlpropagationsachse abzurastern. Durch die limitierte Bewegungsgeschwindigkeit des Verschiebetisches ist dies jedoch zeitaufwendig und Aufnahmen können nicht in Echtzeit gemacht werden. Deshalb werden zum Abrastern die x , y -galvanometrischen Scan-Spiegel (GM, Cambridge Technology, 6215H, \varnothing 5 mm) verwendet. Beim Anlegen einer Spannung an das Kontrollmodul der Scan-Spiegel verändert sich der Winkel des Laserstrahls in der entsprechenden Dimension (x oder y). In Bezug auf die Scan-Geschwindigkeit wird zwischen der schnellen und der langsamen Achse unterschieden. Jede Achse ist einem der beiden Scan-Spiegel zugeordnet. Die schnelle Achse variiert den Laserstrahlwinkel in einer Dimension und generiert so eine abgerasterte Linie. Daraufhin verändert die langsame Achse den Winkel um einen Schritt in der dazu orthogonalen Dimension und es wird erneut in der schnellen Achse eine weitere Linie abgerastert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der komplette vom Nutzer vorgegebene Winkelbereich abgetastet wurde.

Die Steuerung erfolgt über eine MatLab-basierte Software ScanImage 3.8 (ScanImage, Janelia Farm). Die dort ausgewählten Parameter (Auflösung, Scan-Bereich, Scan-Geschwindigkeit usw.) werden in eine Bewegungsabfolge der Spiegel umgerechnet, welche daraufhin an einen Analog-Digital-Wandler (PCI-6110S, National Instruments) geleitet wird. Dieser legt eine Spannung zwischen 0 V und 10 V an das Kontrollmodul der GM an: Jedem Spannungswert entspricht ein bestimmter Verkippungswinkel der galvanometrischen Scan-Spiegel.

Der abbildende Strahlengang (s. Abb. 17, gestrichelte Linien) führt den Strahl über die GM zum fokussierenden Objektiv. Durch die Verkippung des einfallenden Strahls gegenüber der optischen Achse des Objektivs wird der Fokus innerhalb der Fokalebene verlagert (s. Abb. 18). Die hier verwendeten auf unendlich korrigierten Objektive fokussieren einen Laserstrahl auf einen Punkt, der vom Eintrittswinkel in die fokale Ebene des Objektivs abhängt. Um zu gewährleisten, dass der Strahl das Objektiv immer die Fokalebene trifft und dadurch scharfe Abbildungen der zu untersuchenden Probe beim

Rastervorgang generiert, müssen bestimmte Abstände zwischen den GM, den beiden nachfolgenden abbildenden Linsen und dem Objektiv eingehalten werden (s. Abb. 18).

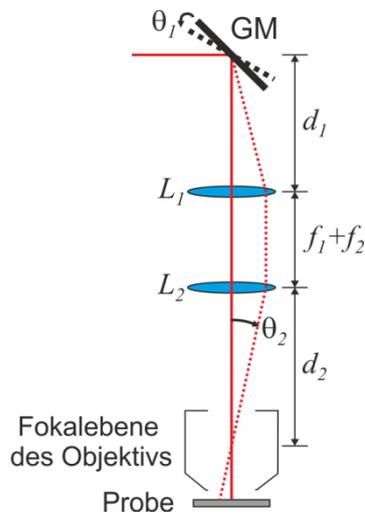


Abb. 18: Schematische Darstellung des abbildenden Strahlengangs ab den galvanometrischen Spiegeln (GM) bis zur Probe. Die Verkippung der GM wird durch eine gestrichelte schwarze Linie angedeutet. Die Linse L_1 mit der Brennweite f_1 parallelisiert den Strahl, während die zweite Linse L_2 mit der Brennweite f_2 das Lichtbündel auf die Fokalebene des Objektivs fokussiert. Der Abstand der Teleskop-Linsen ist die Summe deren Brennweiten $f_1 + f_2$. Der Abstand zwischen GM und L_1 wird als d_1 und der Abstand zwischen L_2 und der Fokalebene des fokussierenden Objektivs als d_2 bezeichnet. θ_1 ist dabei der Drehwinkel der GM und θ_2 der Eintrittswinkel des Strahls in das Objektiv.

Die nachfolgenden mathematischen Beschreibungen dieser Abstände wurden der Arbeit von E. Fällman entnommen und können dort detailliert nachgeschlagen werden [91]. Der Abstand zwischen den GM und der Linse L_1 errechnet sich aus

$$d_1 = \frac{f_1}{f_2} \left(f_1 + f_2 - \frac{f_1}{f_2} \cdot d_2 \right) \quad (3.1)$$

wobei f_1 die Brennweite der Linse L_1 , f_2 die Brennweite der Linse L_2 und d_2 der Abstand zwischen der Linse L_2 und der Fokalebene des Objektivs sind.

Mit $f_1 = 150$ mm, $f_2 = 200$ mm und $d_2 = 360$ mm ergibt sich aus 3.1 für den Abstand zwischen den GM und der Linse L_1 : $d_1 = 60$ mm. Dabei ist der Abstand der beiden Linsen mit den Brennweiten f_1 und f_2 die Summe von deren Brennweiten:

$$f_{12} = f_1 + f_2 \quad (3.2)$$

An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass die beiden abbildenden Linsen auch als ein 1.3-faches Teleskop agieren und den Laserstrahl noch weiter aufweiten. Nach dem Passieren dieses Teleskops betragen die Strahldurchmesser 4.42 mm für den HeNe-Laser, 5.46 mm für den ArKr-Laser und 5.72 mm für die Laserdiode.

Das Verhältnis zwischen dem Drehwinkel der Spiegel θ_1 und dem Eintrittswinkel des Strahls ins Objektiv θ_2 lässt sich mit

$$\theta_2 = -2 \cdot \frac{f_1}{f_2} \cdot \theta_1 \quad (3.3)$$

beschreiben.

Die Drehung der GM führt zur Translation des Fokus auf der Probe. Die Größe des Scanbereichs r hängt dabei linear von der effektiven Fokallänge des Objektivs f_{EFL} und dem Eintrittswinkel des Strahls ins Objektiv θ_2 ab:

$$r = f_{EFL} \cdot \theta_2 = -2 \cdot \frac{f_1}{f_2} \cdot \theta_1 \cdot f_{EFL} \quad (3.4)$$

Zusammen mit $f_{EFL} = 1.8 \text{ mm}$ für ein 100x Ölimmersionsobjektiv ergibt sich in Abhängigkeit vom ausgewählten Drehwinkel der Scan-Spiegel für den maximalen Scanbereich:

$$r = 2.7 \cdot 10^{-3} \cdot \theta_1 \quad (3.5)$$

wobei r in Metern und θ_1 in Radianten angegeben ist. Daraus folgt, dass eine Drehung der GM beispielsweise um 1 mrad einer Verschiebung von $2.7 \mu\text{m}$ auf der Probenoberfläche entspricht. Die Wiederholgenauigkeit der Scan-Spiegel beträgt laut Angaben des Herstellers $8 \mu\text{rad}$, was einer Verschiebung auf der Probenoberfläche von ca. 11.2 nm entspricht.

Durch Verwendung der oben angegebenen Abstände zwischen den einzelnen optischen Elementen lässt sich eine scharfe Abbildung der Probenoberfläche erreichen, indem sie zeilenweise mit dem fokussierten Laserstrahl abgetastet wird. Das zu detektierende Licht wird vom selben Objektiv eingesammelt und anschließend mittels einer Multimode-Faser zum Photomultiplier geleitet (s. Abb. blaue gestrichelte Linie und ab M2 blaue durchgezogene Linie). Dieser liefert ein Spannungssignal, welches annähernd proportional zur einfallenden Lichtmenge ist. Die Visualisierung des detektierten Signals mit Hilfe von ScanImage erfolgt über das Auftragen der PMT-Spannungswerte für jede abgerasterte Probenposition, deren Anzahl durch die vom Benutzer eingestellte Auflösung gegeben ist [92]. Das genaue Prinzip der Bildentstehung in Scan-Image ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt.

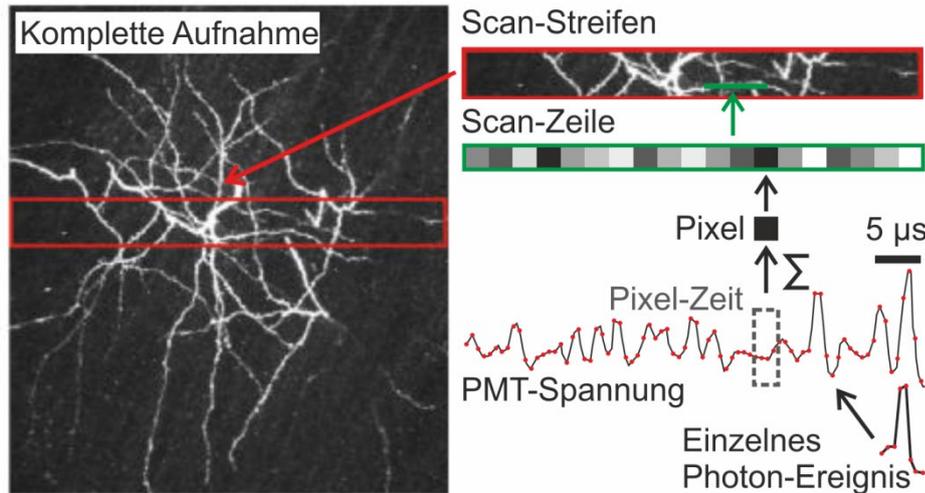


Abb. 19: Bilderzeugung beim Rastervorgang unter Verwendung vom PMT und ScanImage anhand einer exemplarischen fluoreszierenden Probe. Einzelne von der zu untersuchenden Probe zurückgestreuten Photonen werden vom PMT detektiert und in elektrische Signale (Spannungswerte) umgewandelt. Summiert über eine vorgegebene Pixel-Zeit (graues Rechteck), ergibt sich ein Pixel einer Scan-Zeile (schwarzes Quadrat). Die Pixel-Zeit hängt dabei von den in ScanImage wählbaren Anfangsparametern ab: der Anzahl der Pixel pro Scan-Zeile (Auflösung) und der Zeit pro Scan-Zeile. In Abhängigkeit von den Voreinstellungen bilden einzelne Scan-Zeilen (grünes Rechteck) wiederum einen Scan-Streifen (rotes Rechteck), der nahezu in Echtzeit entsteht. Die Aneinanderreihung der Scan-Streifen ergibt eine komplette Aufnahme der Probenoberfläche (adaptiert aus [92]).

Die Verwendung von GM hat den Vorteil, dass beim Abrastern weder die zu analysierende Substanz noch das fokussierende Objektiv bewegt werden müssen. Dementsprechend werden damit verbundene mechanische Erschütterungen vermieden, die beispielsweise beim Scanvorgang mit einem Piezo-Verschiebetisch auftreten. Die GM zeichnen sich außerdem durch eine hohe Scan-Geschwindigkeit und eine damit verbundene kurze Belichtungszeit aus. Dies wird anhand einer Aufnahme einer 100 µm-Skala in Abbildung 20 gezeigt. Für die Erzeugung dieses Bildes mit einer Auflösung von 512x512 Pixeln benötigt man eine Belichtungszeit von ca. 1 s.

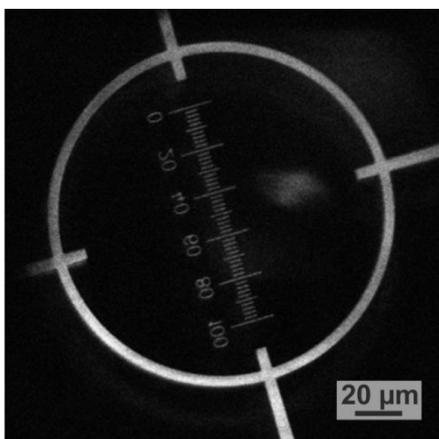


Abb. 20: Exemplarische Abbildung einer 100 µm-Skala, die mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm mittels der GM abgerastert wurde. Die Aufnahme des rückgestreuten Lichts erfolgte mit einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2). Das Bild ist 512x512 Pixel groß und die Belichtungszeit beträgt 2 ms pro Scan-Zeile. Dies entspricht einer Gesamtbelichtungszeit von 1.02 s.

Zusätzlich zum Abrastern der kompletten Probe ist es möglich, bestimmte Punkte auf der Probenoberfläche auszuwählen und gezielt anzufahren (vgl. Kap. 4.3.3 und 4.3.4), um dort Raman- oder Fluoreszenz-Spektren aufzunehmen. Dazu wird die Faser vom Photomultiplier an das Spektrometer umgesteckt. Neben der punktuellen Aufnahme von Spektren besteht weiterhin die Möglichkeit, einen ausgewählten Bereich der Probe zu untersuchen, indem das Signal über diesen Bereich gemittelt wird (s. Abb. 21).

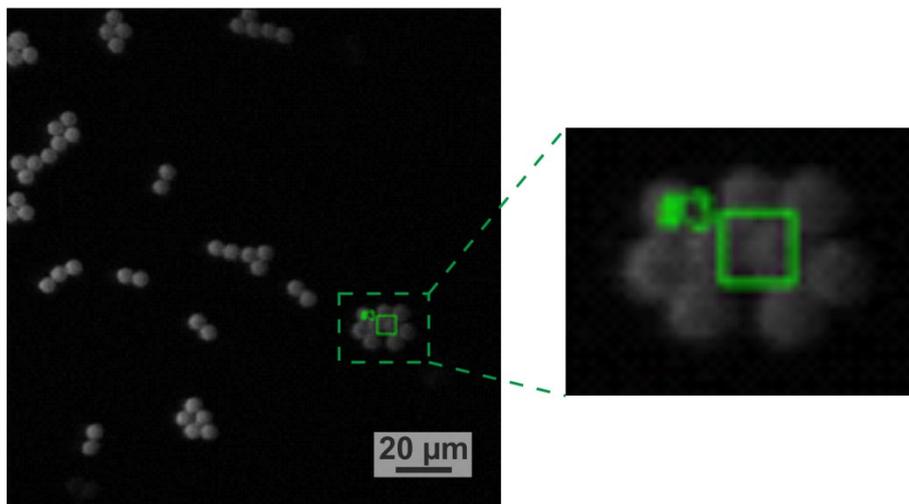


Abb. 21: Eine exemplarische Fluoreszenzaufnahme von Tetraspeck-Partikeln mit einem Durchmesser von 4 µm, aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von 514 nm, einer fokalen Leistung von 5 mW und einem 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3). Die Abbildung ist 512x512 Pixel groß und wurde mit einer Belichtungszeit von 4 ms pro Scan-Zeile aufgenommen. Das grüne durchgezogene Quadrat legt den zu untersuchenden Bereich fest, innerhalb dessen das Raman- oder Fluoreszenz-Signal gemittelt über die abgerasterte Fläche gesammelt wird. Das grün gestrichelte Quadrat markiert den vergrößert dargestellten Probenbereich (rechts).

Sowohl der spektroskopische als auch der abbildende Strahlengang führen auf dem Weg zur zu untersuchenden Substanz über das fokussierende Objektiv (s. Abb. 14). Beim aufgebauten Raman-System erfolgt die Detektion bei beiden Strahlengängen in der Rückwärtsrichtung, d. h. das Laserlicht wird mit Hilfe eines Objektivs auf die zu analysierende Probe fokussiert und das zu detektierende Signal vom selben Objektiv wieder eingesammelt. Die im Weiteren verwendeten Objektive werden in der Tabelle 3 aufgelistet. Es wird der minimal erreichbare Fokusdurchmesser für die größte und kleinste verwendete Anregungswellenlänge angegeben. Wenn im Folgenden die fokale Leistung angegeben wird, kann sie dadurch auf eine Fokusfläche bezogen werden, um die fokale Intensität zu bestimmen.

Bezeichnung	Medium	Vergrößerung	NA	WD [mm]	d_{min} (488 nm/785 nm) [μm]
PLN	Luft	20x	0.4	1.2	0.74/1.20
UPLFLN	Luft	40x	0.75	0.51	0.40/0.64
UPLSAPO	Wasser	60x	1.2	0.28	0.25/0.40
UPLFLN	Öl	100x	1.3	0.2	0.23/0.37

Tab. 3: Zusammenstellung der verwendeten Olympus-Objektive, wobei NA für die numerische Apertur und WD (engl. *Working Distance*) für den Arbeitsabstand stehen. Der theoretisch erreichbare Fokusedurchmesser d_{min} wurde über die angegebene NA für zwei Anregungswellenlängen 488 nm und 785 nm bestimmt.

Da das Raman-Spektrometer über verschiedene Anregungswellenlängen im Vis- und NIR-Bereich verfügt, sind die spektralen Transmissionseigenschaften der oben genannten Objektive von großer Bedeutung. Diese werden in Abbildung 22 gezeigt.

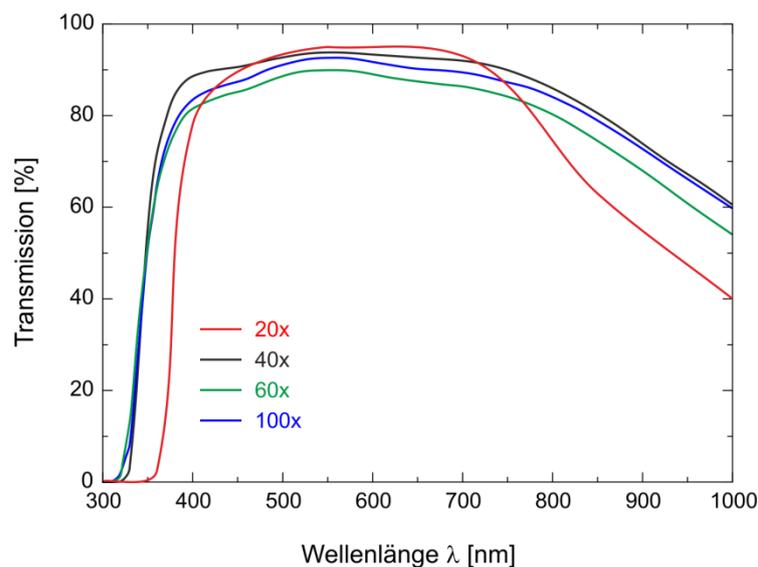


Abb. 22: Vom Hersteller Olympus angegebenen Transmissionskurven der verwendeten Objektive in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Die Wahl des verwendeten Objektivs hängt von der zu untersuchenden Substanz ab: Bei dünnen und biologischen Proben kommen aufgrund des kleineren Fokus hochnumerische Objektive zum Einsatz, während beispielweise bei Proben in Küvetten Trockenobjektive mit einem vergleichsweise großen Arbeitsabstand eingesetzt werden müssen.

Das vom Objektiv eingesammelte Licht wird unabhängig vom Strahlengang (spektroskopisch oder abbildend) zum dichroitischen Strahlteiler (DST) geführt

(s. Abb. 17). Dieser Strahlteiler transmittiert nur den längerwelligen Anteil der Strahlung in Richtung des Detektionssystems, der kürzerwellige Anteil wird reflektiert. Für jede Wellenlänge wird ein geeigneter DST verwendet, der über hohe Transmissionswerte für den längerwelligen Spektralbereich verfügt. Die verwendeten DST sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

DST	Wellenlänge [nm]
zt 488 RDC	488
HC BS 525	514
zt 568 RDC	568
zt 633 RDC	633
HC BS 649	647

Tab. 4: Zusammenstellung der verwendeten Strahlteiler.

Für die Einkopplung der 785 nm-Laserdiode dient der Notch-Strahlteiler (s. Abb. 14, F1) als dichroitischer Strahlteiler. Er ist fest eingebaut und bleibt auch bei Messungen mit anderen Wellenlängen im Strahlengang. Aufgrund einer Transmission von über 93% im Bereich zwischen 400-742.1 nm und 827.9-1600 nm blockiert F1 dementsprechend nicht das mit anderen Wellenlängen angeregte Raman- oder Fluoreszenz-Signal.

Bei den verwendeten DST (s. Tabelle 4) handelt es sich um hochwertige Optiken, die eine hohe Transmission für die Stokes-Raman-Photonen in Bezug auf die Anregung im längerwelligeren Spektralbereich aufweisen. Herstellungsbedingt lassen sie trotzdem noch einen restlichen Anteil von ca. 2-3% des rückgestreuten Laserlichts durch. Nach dem Passieren des Strahlteilers wird deshalb das Raman-Licht mittels eines Langpassfilters (LP) vom restlichen Rayleigh-gestreuten Licht getrennt (s. Kap. 2.2.2). In Tabelle 5 ist eine Zusammenstellung der verwendeten Langpassfilter dargestellt.

LP	Wellenlänge [nm]
HQ 500 LP	488
RazorEdge Sperrfilter LP 514 RU	514
RazorEdge Sperrfilter LP 568 RU	568
RazorEdge Sperrfilter LP 633 RU	633
RazorEdge Sperrfilter LP 647 RU	647
RazorEdge Sperrfilter LP 785 RU	785

Tab. 5: Zusammenstellung der verwendeten Langpassfilter.

Nach dem Langpassfilter wird das spektral gefilterte Raman-Signal über ein Trockenobjektiv (Olympus, PLN, 10X, NA 0.25) (s. Abb. 23) in eine Multimode-Step-Index-Faser (Thorlabs, 50 μm , NA 0.22, 400-2400 nm) einkoppelt. Die Faser gewährleistet dabei die Konfokalität und führt entweder zur Aufnahme von Raman- bzw. Fluoreszenz-Spektren zum Monochromator (Acton 2300i, Princeton Instruments) mit einer thermoelektrisch gekühlten CCD-Kamera (Newton, DU 920P BR-DD, Andor) oder beim Abrastern der Probe zum Photomultiplier (PMT) (Photomultiplier, Hamamatsu, H 9656-20, 300-920 nm) (s. Abb. 14).

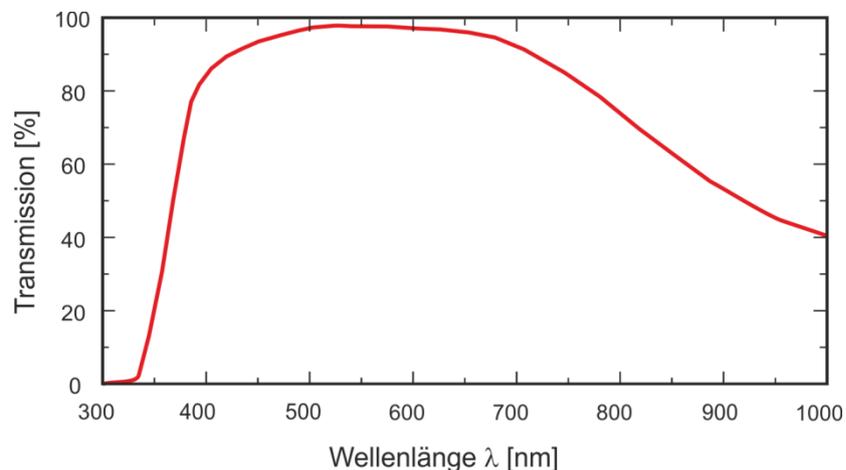


Abb. 23: Vom Hersteller angegebene Transmissionskurve des zur Einkopplung in die Multimode-Step-Index-Faser verwendeten Trockenobjektivs (Olympus PLN, 10x, NA 0.25) in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Charakterisierung der eingesetzten Detektoren:

1. Der spektroskopische Strahlengang:

Der als Spektrometer verwendete Monochromator dient der spektralen Dispersion von Licht und basiert auf dem Czerny-Turner-Prinzip (s. Abb. 24). Das polychromatische Licht tritt fasergekoppelt in die Anordnung ein und wird von einem planaren Spiegel M um 90° abgelenkt und zum ersten Hohlspiegel F_1 umgelenkt. Dieser Spiegel parallelisiert das Lichtbündel und reflektiert es auf das Reflexionsgitter, an dem es spektral aufgespalten wird. Das spektral aufgetrennte Licht verlässt das Gitter für unterschiedliche Wellenlängen unter unterschiedlichen Winkeln und wird anschließend vom zweiten Hohlspiegel F_2 auf den CCD-Sensor fokussiert. Dabei wird jede Wellenlänge auf einen anderen Punkt des CCD-Chips fokussiert. In Abhängigkeit von der Gitterstellung wird nur ein bestimmter schmaler Ausschnitt des gesamten Spektralbereichs auf den CCD-Chip abgebildet.

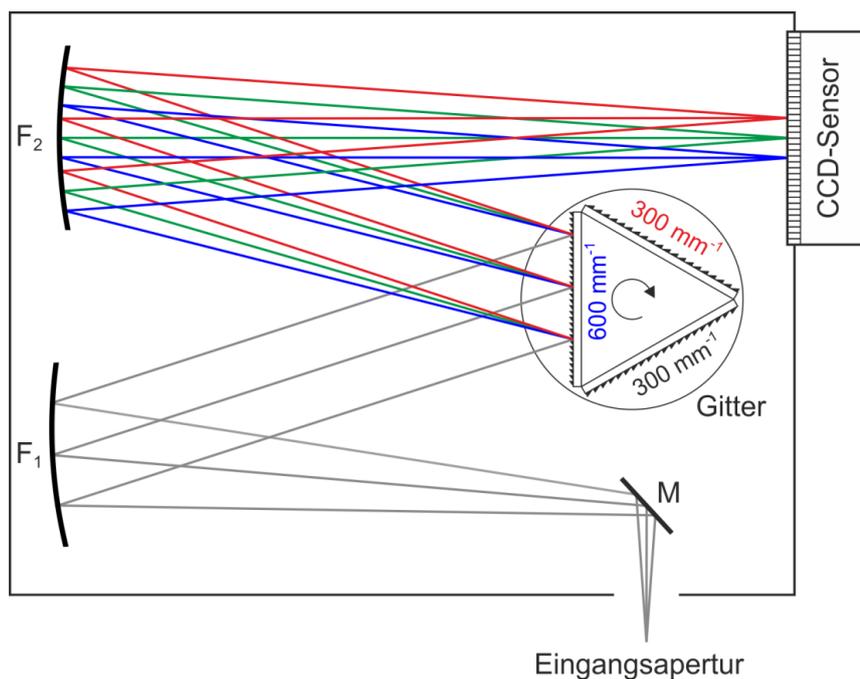


Abb. 24: Schematische Darstellung der Funktionsweise des verwendeten Czerny-Turner-Monochromators. Das Licht wird mittels einer Multimode-Faser in den Monochromator eingekoppelt (Eingangsapertur) und am Spiegel M um 90° zum Hohlspiegel F_1 umgelenkt. Dieser kollimiert das Lichtbündel und reflektiert es zu einem drehbaren Halter mit drei unterschiedlichen Reflexionsgittern. Am Gitter wird das Licht in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Zwei der Gitter haben 300 Striche pro mm und eins 600 Striche pro mm. Sie unterscheiden sich des Weiteren in ihrer wellenlängenabhängigen Effizienz. Anschließend wird das spektral aufgespaltene Licht vom zweiten Hohlspiegel F_2 auf den CCD-Sensor fokussiert.

Je nach dem gewünschten Wellenlängenbereich können verschiedene Gitter im Monochromator benutzt werden. Die verwendeten Gitter verfügen über zwei in Bezug auf die spektrale Zerlegung wichtige Parameter: Die Anzahl der Linien und die Blaze-Wellenlänge.

Das Auflösungsvermögen des Spektrometers ist proportional zur Anzahl der Gitterlinien, d. h. je mehr Gitterfurchen ein Gitter hat, desto höher ist die damit erreichte Auflösung. Allerdings verkleinert sich mit steigender Strichzahl der Wellenzahlbereich, den man auf einmal abbilden kann. Beispielsweise wird im verwendeten Spektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm und einem Gitter mit 300 Strichen pro mm ein Wellenzahlbereich von ca. $\Delta k = 3200 \text{ cm}^{-1}$ abgebildet. Im Fall eines Gitters mit 600 Strichen pro mm sind es ca. $\Delta k = 2100 \text{ cm}^{-1}$. Es kann somit nur ein gewisser Wellenzahlbereich bei einem festen Drehwinkel des Gitters gegenüber dem einfallenden Strahl detektiert werden. Möchte man jedoch einen größeren Wellenzahlbereich abbilden, so muss das Gitter auf dem Drehteller nach der Aufnahme des ersten Raman-Spektrums um einen gewissen Winkel weiter gedreht werden. Bei dieser Winkeleinstellung wird dann das nächste Raman-Spektrum aufgenommen etc., bis der komplette gewünschte Wellenzahlbereich abgedeckt ist. Anschließend werden die einzelnen aufgenommenen Spektren zusammengefügt.

Der andere wichtige Gitterparameter ist die Blaze-Wellenlänge, die die Wellenlänge angibt, bei der das benutzte Gitter den höchsten Wirkungsgrad besitzt. Da bei der spontanen Raman-Spektroskopie wenig Licht für die spektrale Analyse zur Verfügung steht, werden sogenannte Blaze-Reflexionsgitter bevorzugt eingesetzt. Aufgrund ihres sägezahnähnlichen Profils reflektieren diese Stufengitter das Licht in eine bevorzugte Beugungsordnung. Dabei hängt das Maximum der Intensitätsverteilung vom Neigungswinkel der Stufen ab. Im verwendeten Monochromator befindet sich ein Dreifach-Gitterhalter mit drei Blaze-Reflexionsgittern (s. Abb. 24). Diese verfügen infolge ihrer unterschiedlichen Blaze-Wellenlängen über verschiedene spektrale Eigenschaften (s. Abb. 25).

Eins der verwendeten Gitter hat eine Blaze-Wellenlänge von 500 nm und 300 Striche pro mm und wird für die Anregungswellenlängen von 488 nm, 514 nm, 520 nm und 532 nm eingesetzt (s. Abb. 25, schwarz). Zwei weitere Gitter eignen sich mit der Blaze-Wellenlänge von 750 nm und 300 Strichen pro mm (s. Abb. 25, rot) bzw. 1000 nm mit 600 Strichen pro mm (s. Abb. 25, blau) für die Anregung mit 568 nm, 633 nm, 647 nm und 785 nm.

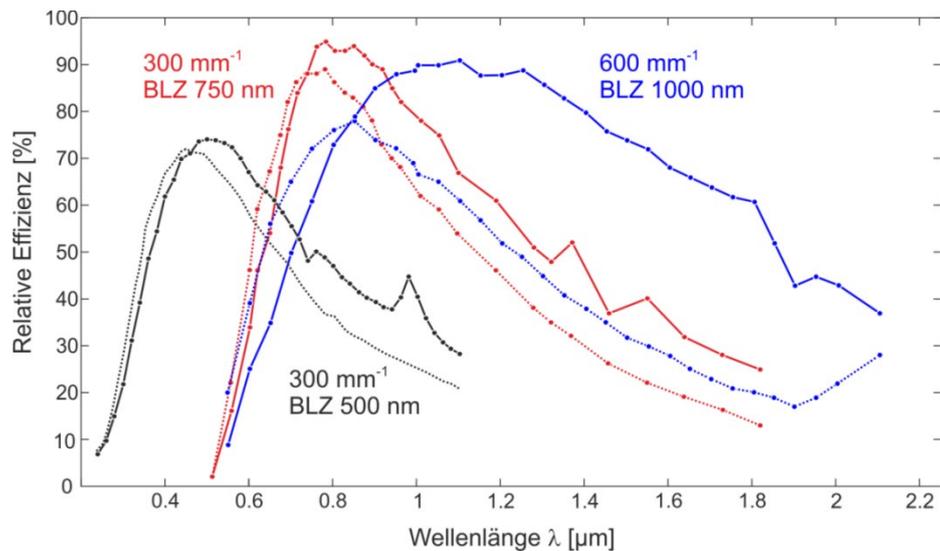


Abb. 25: Effizienzkurven der verwendeten Blaze-Gitter in Abhängigkeit von den Wellenlänge: 300 Striche pro mm und Blaze-Wellenlänge von 500 nm (schwarz), 300 Striche pro mm und Blaze-Wellenlänge von 750 nm (rot), 600 Striche pro mm und Blaze-Wellenlänge von 1000 nm (blau). Die Effizienz für die s-Polarisation wird als durchgezogene Linie mit den eingezeichneten Messpunkten dargestellt. Die Effizienz für die p-Polarisation wird als gestrichelte Linien kenntlich gemacht. Die Kurven wurden vom Hersteller Princeton Instruments zur Verfügung gestellt.

Das im Monochromator spektral zerlegte Licht wird anschließend auf den CCD-Chip geschickt, der ein Array aus elektrisch miteinander gekoppelten Photoelementen (Pixeln) darstellt, wobei jedes Pixel als ein kleiner Metalloxid-Halbleiter-Kondensator aufgebaut ist. Einfallende Photonen werden innerhalb eines Photoelements absorbiert und erzeugen dort durch den inneren photoelektrischen Effekt Ladungen, die nach einer Verstärkung schließlich von einem Analog-Digital-Konverter in digitale Messsignale umgewandelt werden können.

Der hier verwendete CCD-Sensor (Newton, DU 920P BR-DD, Andor) besitzt 1024x256 Pixel, wobei jedes Pixel eine Größe von 26x26 μm hat. Somit verfügt der Chip über eine aktive Fläche von 26.7x6.7 mm. Um temperaturabhängiges Dunkelrauschen zu reduzieren, wird die CCD-Kamera für die Messungen auf -80°C thermo-elektrisch gekühlt. Da die zu detektierenden Raman-Signale über einen großen Spektralbereich verteilt sein können, muss der CCD-Sensor eine ausreichende spektrale Empfindlichkeit in diesem Wellenlängenbereich aufweisen (s. Abb. 26).

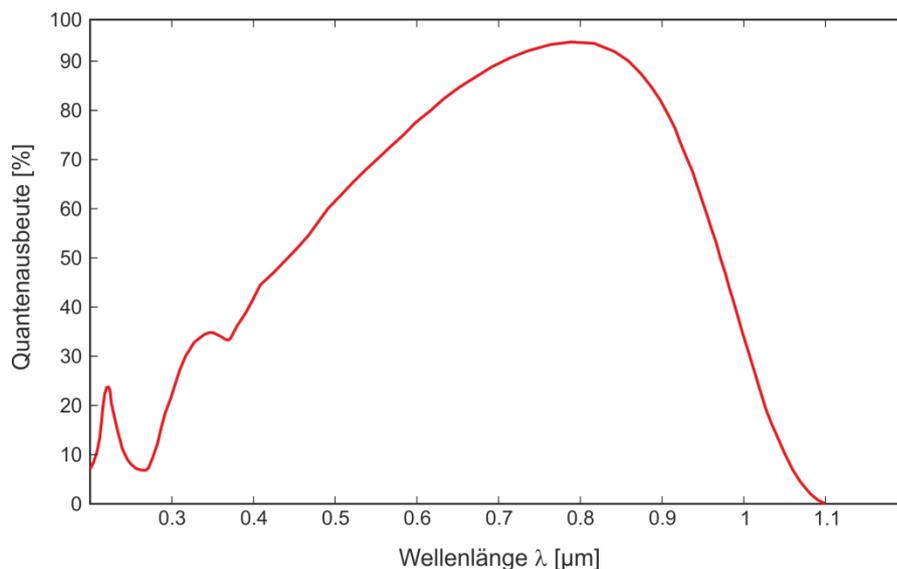


Abb. 26: Die vom Hersteller Andor angegebene Quantenausbeute der verwendeten CCD-Kamera aufgetragen gegen die Wellenlänge.

Wie sich der Abbildung 26 entnehmen lässt, ist die Empfindlichkeit des benutzten CCD-Sensors besonders hoch im Vis-Bereich, nimmt jedoch im NIR-Bereich ab. Infolgedessen müssen die aufgenommen Raman-Spektren unter Berücksichtigung der spektralen Empfindlichkeit der verwendeten Geräte um eine entsprechende Funktion korrigiert werden. Diese ergibt sich aus der Multiplikation der Quantenausbeute der CCD-Kamera, der Reflektivität des Gitters und der Transmission der Objektive. In Abbildung 27 wird der Einfluss des Korrekturalgorithmus an einem exemplarischen Raman-Spektrum von Polystyrol mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm demonstriert. Dabei wurden zwei exemplarische Raman-Peaks bei $k_1 = 1001 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_1 = 852 \text{ nm}$) und $k_2 = 3005 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_2 = 1072 \text{ nm}$) ausgewählt, die $\Delta k = \text{ca. } 2004 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\lambda = 175 \text{ nm}$) auseinander liegen. Im nicht-korrigierten Spektrum beträgt das Verhältnis der beiden Raman-Resonanzen $I_{1001}/I_{3005} = 13.4$ (s. Abb. 27a). Nach dem Anwenden der Korrekturfunktion ergibt sich das Verhältnis dieser Peaks zu $I_{1001}/I_{3005} = 1.1$ (s. Abb. 27b). Dies entspricht einem Faktor von ca. 12, der nicht zu vernachlässigen ist. Aufgrund dessen ist es notwendig, auf die aufgenommenen Raman-Spektren vor der Auswertung den Korrekturalgorithmus anzuwenden. Ab jetzt werden nur korrigierte Spektren gezeigt, wenn nichts Anderes angemerkt ist.

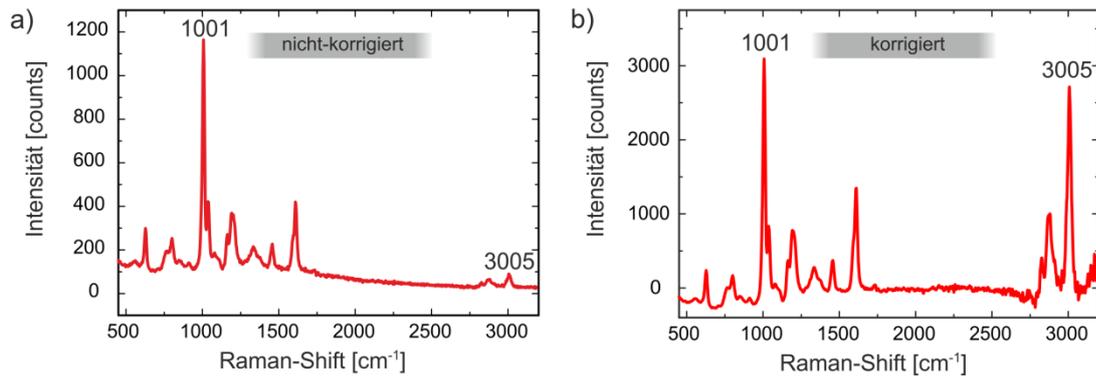


Abb. 27: Exemplarische Raman-Spektren von Polystyrol-Pulver. Die Raman-Messungen erfolgten auf einem Borosilikat-Substrat mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 15 mW, einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) und einer Belichtungszeit von 1 s. Jedes der beiden Spektren ist eine Akkumulation über 3 einzelne Spektren an derselben Stelle. a) zeigt ein Roh-Raman-Spektrum (nicht-korrigiert), während in b) ein unter Berücksichtigung der Effizienz der Detektoren und der Objektive korrigiertes Raman-Spektrum ohne Hintergrundabzug dargestellt ist (korrigiert). Der Peak bei 1001 cm^{-1} ist die Atmungsmode des Phenylrings und der Peak bei 3005 cm^{-1} die C-H-Streckschwingung.

2. Der abbildende Strahlengang:

Die Abbildung der Probenoberfläche erfolgt beim Rastervorgang mit den galvanometrischen Spiegeln, wobei ein fasergekoppelter Photomultiplier (Photomultiplier, Hamamatsu, H9656-20, 300-920 nm) zur Detektion benutzt wird. Ein Photomultiplier dient der Verstärkung schwacher Lichtsignale und deren Umwandlung in messbare elektrische Signale. Seine Funktionsweise beruht auf dem äußeren photoelektrischen Effekt: Durch einen kaskadischen Verstärkungsprozess kann ein einzelnes einfallendes Photon bis zu 10^6 Elektronen erzeugen [93].

Der für die Arbeit verwendete Photomultiplier muss eine hohe Empfindlichkeit über einen breiten spektralen Bereich aufweisen, um das Fluoreszenz- oder das Raman-Licht bei Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen effizient zu detektieren. Aus diesem Grund wird für den Aufbau ein Photomultiplier von Hamamatsu verwendet, der mit einer Photokathode mit einer Multialkali-Beschichtung ausgestattet ist. Diese Beschichtung weist eine hohe Empfindlichkeit im Wellenlängenbereich zwischen 450 nm und 850 nm auf (s. Abb. 28). Im äußeren Spektralbereich von 300 nm bis 920 nm nimmt die PMT-Empfindlichkeit zwar um ca. zwei Größenordnungen ab, es können aber auch in diesem Spektralbereich Messungen vorgenommen werden. Das erreichbare Signal-zu-Rausch-Verhältnis wäre jedoch deutlich reduziert.

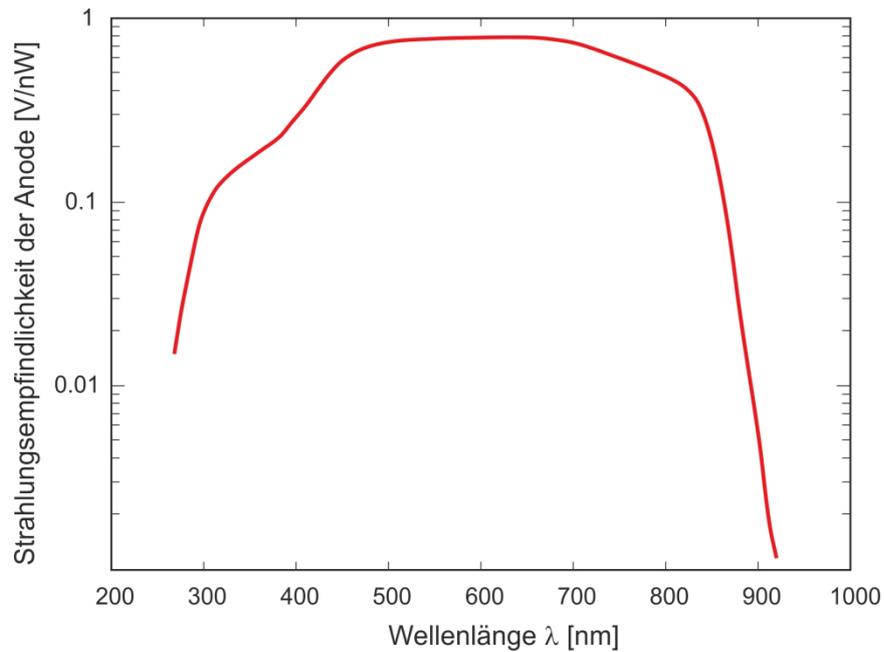


Abb. 28: Die spektrale Empfindlichkeit des verwendeten PMT-Moduls (Typ H9656-20) der Firma Hamamatsu bei einer Steuerspannung von 0.8 V.

3.2 Möglichkeiten multispektraler Analyse

Wie bereits in Kap. 3.1 erwähnt, kann das aufgebaute Raman-Spektrometer mit acht verschiedenen Wellenlängen im Vis- und NIR-Bereich (488 nm, 514 nm, 520 nm, 532 nm, 568 nm, 633 nm, 647 nm und 785 nm) betrieben und mit geringem Aufwand um weitere Wellenlängen erweitert werden. Die Vielzahl der möglichen Anregungswellenlängen macht das System flexibel für verschiedene Anwendungen. Beispielsweise zeigen viele biologische Substanzen, wie rote Blutkörperchen oder Aminosäuren, eine starke Autofluoreszenz im Vis-Bereich [94]. Bei Raman-Messungen kommen deshalb Laser im roten bzw. nahinfraroten Spektralbereich zum Einsatz (hier: 633 nm, 647 nm oder 785 nm). Zudem können sequenzielle Messungen mit allen zur Verfügung stehenden Anregungswellenlängen durchgeführt werden. Dadurch kann für eine Probe die Abhängigkeit des Raman-Signals von der Anregungswellenlänge untersucht werden. Diese Messmethode wird in Kapitel 4.4 angewandt.

Die Verwendung einer optischen Falle ermöglicht das Einfangen eines einzelnen Objektes mit Abmessungen im μm -Bereich durch einem stark fokussierten Laserstrahl (s. Kap. 2.2.3). Durch Einsatz von zwei verschiedenen Anregungslasern kann das Einfangen eines Partikels durch den einen Laserstrahl erfolgen, während der andere Laserstrahl zur Aufnahme von Raman-Spektren verwendet werden. Bei der Wahl der beiden Laserwellenlängen ist zu berücksichtigen, dass bei kürzeren Wellenlängen eine

erhöhte Gefahr irreversibler Probenschädigung durch hohe Leistungsdichten im Laserfokus besteht [95]. Die Beschädigung der Probe ist primär auf die lokale laserinduzierte Aufheizung der zu untersuchenden Substanz oder des umgebenden Mediums zurückzuführen [96]. Dieser Aspekt muss vor allem bei resonanter Anregung von biologischen Proben in Betracht gezogen werden, die in der Regel im UV- und Vis-Bereich erfolgt [96]. Zum Einfangen des Partikels wird deshalb in der Regel ein Laser im NIR-Bereich verwendet. Die Laserleistung kann dadurch hoch genug gewählt werden, um eine stabile optische Falle mit minimierter Schadensgefahr zur Analyse des resonanten Verhaltens von biologischen Substanzen zu bilden. Ein kurzwelliger Laser wird dann mit einer resonanten Anregungswellenlänge zur Erzeugung des Raman-Signals verwendet. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Leistung der verwendeten Laser sich unabhängig voneinander an die Anforderungen der jeweiligen Probe anpassen lässt. Die Anwendbarkeit der optischen Falle mit mehreren Wellenlängen wurde bereits von Ramser et. al anhand resonanter Anregung von Erythrozyten gezeigt: Das Einfangen einzelner roter Blutkörperchen erfolgte mit einer Wellenlänge von 830 nm, während die resonante Anregung der Häm-Moleküle mit der darauffolgenden Aufnahme der Raman-Spektren mit 488 nm, 514 nm und 568 nm stattfand [94].

Da die spontane Raman-Spektroskopie auf der inelastischen Streuung des Lichts an Molekülschwingungen beruht, bedarf sie keiner externen Marker. In gewissen Fällen ist es allerdings notwendig, Fluoreszenzfarbstoffe als Marker an bestimmte Substanzen anzubringen, um diese in der Probe lokalisieren zu können. Dabei ist es von Vorteil, wenn das Raman-Spektrometer über mehrere Anregungswellenlängen verfügt: Die markierte Substanz wird mit einer zum Fluorophor passenden Anregungswellenlänge abgerastert, um ein Fluoreszenzbild zu erzeugen, und anschließend werden Raman-Spektren mit einer anderen Wellenlänge an genau definierten Stellen aufgenommen. Von großem Interesse ist diese Anwendung bei Strukturen, deren Größe unterhalb der Auflösungsgrenze liegt und die mit der konventionellen Lichtmikroskopie nicht detektierbar sind. Dies wird im Folgenden an ausgewählten Beispielen gezeigt.

Bei den in Abbildung 29a gezeigten TetraSpeck-Kügelchen handelt sich um fluoreszierende Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm, die sich zur Fluoreszenzemission mit vier unterschiedlichen Wellenlängen im Vis-Spektralbereich anregen lassen. Bei einer Anregung mit 488 nm wurde mit dem PMT eine Fluoreszenzaufnahme der Probenoberfläche gemacht (s. Abb. 29a). Daraufhin wurden Probenpositionen mit hoher Signalintensität einzeln angefahren, um dort Raman-Spektren aufzunehmen (s. Abb. 29b). Die Größe der Polystyrol-Partikel entspricht ungefähr der Größe eines durchschnittlichen HIV-Partikels [97]. Dementsprechend würde sich die vorgestellte Herangehensweise auch für die Analyse von fluoreszenzmarkierten HIV-Partikeln eignen.

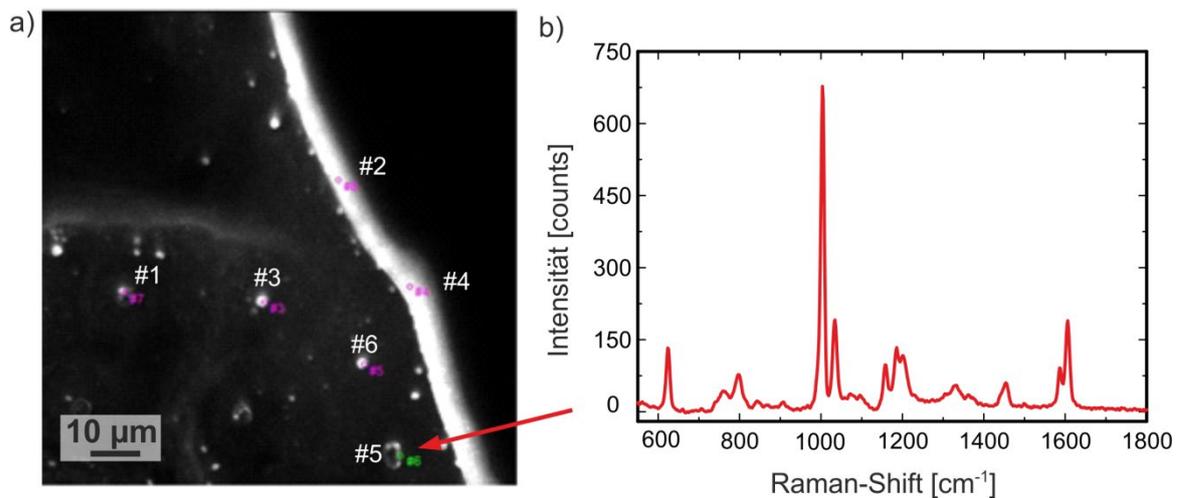


Abb. 29: a) PMT-Fluoreszenzaufnahme von Tetraspeck-Beads (Durchmesser: 100 nm) immobilisiert auf einem Magnesiumfluorid-Substrat. Die Oberfläche wurde mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer fokalen Leistung von 5 mW abgerastert. Das Bild ist 512x512 Pixel groß und die Belichtungszeit beträgt 4 ms pro Scan-Zeile. b) Exemplarisches Raman-Spektrum, das auf der Stelle 5 (markiert mit einem roten Pfeil) mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 17 mW und einer Belichtungszeit von 0.5 s aufgenommen wurde. Sowohl für a) als auch für b) wurde ein 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3) verwendet.

In einigen biologischen Proben befindet sich die DNA in einem bestimmten Entwicklungsstadium nicht in konzentrierter Form im Kern, sondern liegt um den Nukleus. Dies ist zum Beispiel bei ca. 70% der gesamten Maus-Eizellen während der Reifeteilung der Fall [98]. Der Durchmesser einer Oozyte beträgt ca. 70-80 μm und der Durchmesser des Kerns ca. 8-10 μm [99], [100]. Der DNA-Durchmesser liegt mit nur ca. 2 nm [101] unterhalb der Auflösungsgrenze von konventionellen Lichtmikroskopen, weshalb ein externer Marker (hier: Diamidino-phenyllindol-dihydrochlorid, DAPI) für die DNA-Lokalisierung innerhalb einer Zelle eingesetzt werden muss (s. Abb. 30a). Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der eine Affinität zur DNA aufweist und demzufolge zur Zellkernfärbung eingesetzt wird (Absorption: 358 nm, Emission: 461 nm). Um DAPI anzuregen, wurde das Raman-System vorübergehend mit einer weiteren Laserquelle (404 nm, Radius 405-25, Coherent) mit einer Emissionswellenlänge von 405 nm erweitert.

Nach der orts aufgelösten Abbildung des Fluoreszenz-Signals mit dem PMT wurden mittels ScanImage verschiedene Probenstellen mit hoher Signalintensität ausgewählt, an denen anschließend Raman-Spektren aufgenommen wurden (s. Abb. 30b). Das Auftreten der DNA-spezifischen Resonanzen bei 1092 cm^{-1} (symmetrische Streckschwingung der Phosphat-Gruppe) und 1577 cm^{-1} (symmetrische Streckschwingung der Purin-Gruppe) im Spektrum ist ein Nachweis für die DNA an der untersuchten Probenposition in der vorliegenden Zelle. Diese Herangehensweise könnte zum Beispiel bei der Untersuchung von externen Einflüssen (z. B. UV-Einstrahlung oder Wirkung von Zytostatika bei Krebserkrankungen) auf die DNA-Struktur oder ihren internen Veränderungen (z. B. bei

bestimmten Erkrankungen) zum Einsatz kommen. Allerdings setzt dies voraus, dass der verwendete Farbstoff das Raman-Spektrum nicht signifikant beeinflusst.

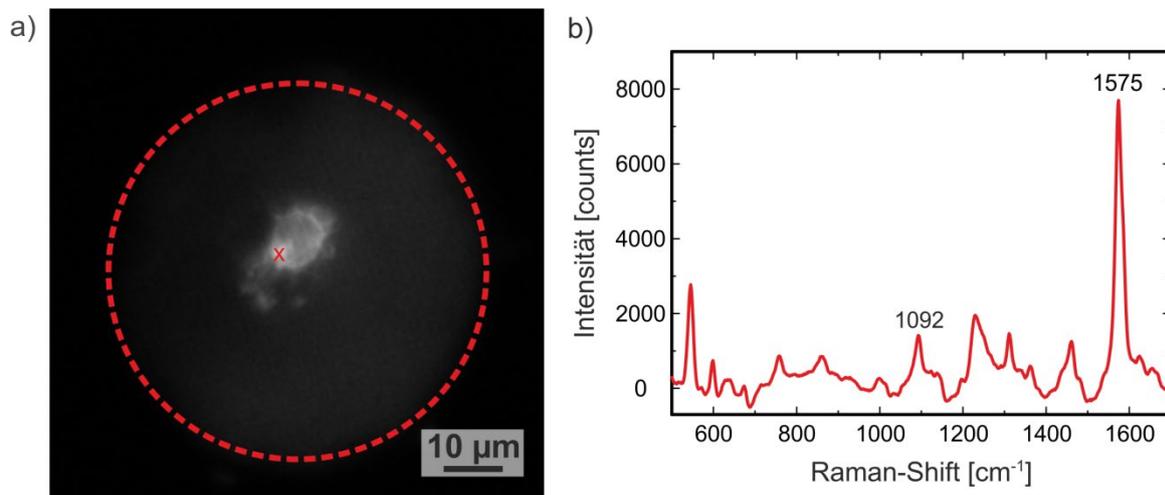


Abb. 30: a) Fluoreszenzaufnahme eines mit DAPI markierten Zellkerns einer mit 4% PVA fixierten Maus-Oozyte auf einem Magnesiumfluorid-Substrat in phosphatgepufferter Salzlösung. Die Probenoberfläche wurde mit der Anregungswellenlänge von 405 nm und einer fokalen Leistung von 7 mW abgerastert. Der rot gestrichelte Kreis markiert die laterale Ausdehnung der Eizelle. b) Exemplarisches Raman-Spektrum, das mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW und einer Belichtungszeit von 30 s auf der in a) mit einem roten Kreuz markierten Stelle aufgenommen wurde. Das Spektrum ergibt sich aus der Akkumulation von 3 an derselben Stelle aufgenommenen Spektren. Es sind zwei Raman-Resonanzen bei 1092 cm^{-1} (symmetrische Streckschwingung der Phosphat-Gruppe) und 1575 cm^{-1} (symmetrische Streckschwingung der Purin-Gruppe) eingezeichnet, die die DNA-Marker sind. Sowohl in a) als auch in b) wurde ein 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) verwendet.

3.3 Unterschiede zwischen verschiedenen Trägermaterialien für die spontane Raman-Spektroskopie

In Kapitel 2.2.3 wurde beschrieben, dass die Fluoreszenz ein dominanter, mit der spontanen Raman-Spektroskopie konkurrierender Prozess ist. Das Fluoreszenzlicht kann sowohl von der Probe selbst als auch von herstellungsbedingten Verunreinigungen im verwendeten Substrat kommen. Die Autofluoreszenz der Probe lässt sich durch die Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge minimieren bzw. vollständig vermeiden (vgl. Kap. 2.2.3). Die verwendeten Substrate weisen oftmals eine um ein Vielfaches größere Dicke und eine höhere Dichte als die zu untersuchende Substanz auf. Dies führt dazu, dass die erhaltenen Spektren hauptsächlich Raman-Resonanzen des Trägermaterials enthalten, die nicht von Interesse sind und störende spektrale Beiträge liefern. Dementsprechend ist das verwendete Substrat von großer Bedeutung. Durch eine geeignete Wahl der Trägermaterialien kann deren Einfluss jedoch signifikant verringert

werden. Dafür müssen die Substrate mehrere Eigenschaften gleichzeitig erfüllen. Sie sollten

- chemisch weitgehend inert sein, so dass sie auch in der Anwesenheit von Lösungsmitteln keine chemische Veränderung durchlaufen;
- ein möglichst geringes Eigenspektrum weit außerhalb des Fingerabdruck-Bereichs und eine möglichst geringe oder im Idealfall keine Autofluoreszenz aufweisen;
- transparent sein, um eine möglichst große Vielfalt von Messkonfigurationen zu ermöglichen. In den meisten Fällen erfolgen die Anregung und die Detektion der Raman-Photonen mit demselben Objektiv entweder in die Vorwärts- oder Rückwärtsrichtung. Transparente Substrate bieten die Möglichkeit, die Fokussierung des Laserlichts und das Aufsammeln des gestreuten Raman-Signals bei Bedarf mit zwei entgegengesetzt angeordneten Objektiven zu realisieren. Die konstruktive Überlagerung der beiden entgegenlaufenden Wellenfronten in einer Zwei-Mikroskopobjektiv-Anordnung würde eine Verkleinerung des Laserfokus und damit eine Verbesserung der Auflösung zur Folge haben. Bei Verwendung transparenter Trägermaterialien könnte die zu analysierende (nicht-flüssige) Substanz in der Rückwärtsdetektion sowohl auf der Oberseite als auch Unterseite des Substrats hinsichtlich des Objektivs angebracht werden. Bei einem Trockenobjektiv und einer Probe, die zum Objektiv hin zeigt, muss der Laserstrahl auf dem Weg zur eigentlichen Probe nicht erst durch das Trägermaterial durch, d. h. der Fluoreszenzbeitrag des Substrats zum Raman-Signal wird minimiert;

Dadurch ist die Wahl der in Frage kommenden Substrate bereits stark eingeschränkt. Gewöhnliche Borosilikat-Deckgläschen (BK7) können nur bei starken Raman-Streuern (z. B. Toluol, Polystyrol usw.) als Substrate eingesetzt werden, weil deren Raman-Signatur die Eigenfluoreszenz des Substrates überdeckt. Zur Veranschaulichung wurden zum Vergleich Raman-Messungen an einem Borosilikat- (s. Abb. 31) und einem Quarz-Substrat (s. Abb. 31) durchgeführt. Bei Anregung mit 785 nm tritt für Borosilikat eine dominante Fluoreszenzstruktur zwischen ca. 1000 cm^{-1} und 2000 cm^{-1} auf, die auf herstellungsbedingte Verunreinigungen im verwendeten Trägermaterial zurückzuführen ist.

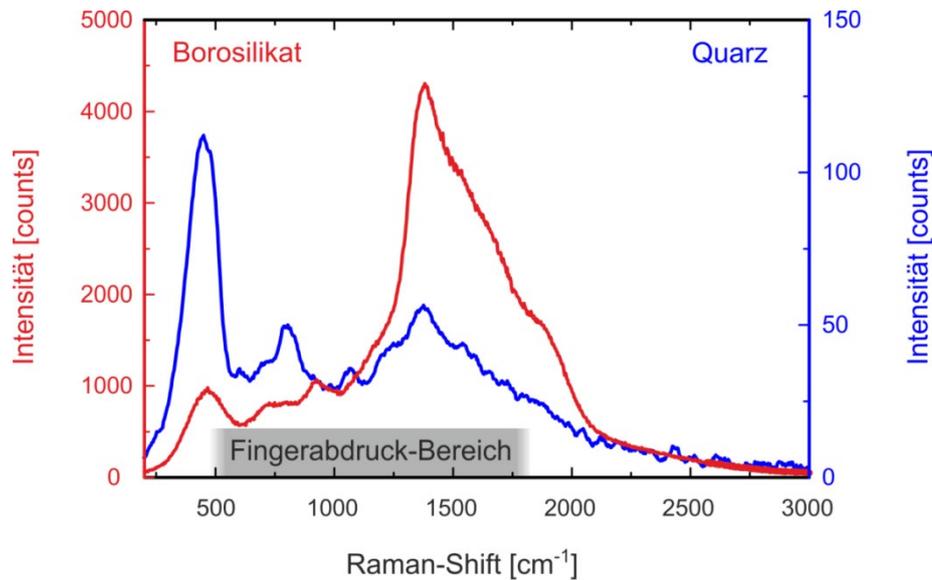


Abb. 31: Exemplarische Raman-Spektren von einem a) Borosilikat-(rot) und einem b) Quarz-Substrat (blau). Die Spektren wurden unter den gleichen Bedingungen mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 10 mW, einem 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3) und einer Belichtungszeit von 2 s aufgenommen.

Bei den gleichen Messbedingungen zeigt ein Quarz-Substrat zwar auch ein Eigenspektrum (s. Abb. 31), dieses ist aber im Fingerabdruck-Bereich zwischen 500 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} schwach ausgeprägt. Aufgrund dessen eignen sich Quarz-Trägermaterialien besser als BK7-Substrate für die spontane Raman-Spektroskopie.

Eine weitere Verbesserung in Bezug auf die Hintergrundfluoreszenz des verwendeten Substrates stellen Magnesiumfluorid (MgF_2) oder Calciumfluorid (CaF_2) dar, weil sie keine Eigenresonanzen im Fingerabdruck-Bereich aufweisen.

Um die Einflüsse verschiedener Substrate (BK7, MgF_2 und Spiegel) auf die spontane Raman-Spektroskopie zu verdeutlichen, wurden auf jedes Trägermaterial jeweils $20\text{ }\mu\text{l}$ einer Mischung aus $8\text{ }\mu\text{m}$ großen Polystyrol-Beads und Wasser aufgetragen und eintrocknen gelassen. Dabei war das Beads-Gemisch so stark verdünnt, dass überwiegend einzelne Kügelchen mit einem Kügelchen-Kügelchen-Abstand im Bereich von mindestens $20\text{-}25\text{ }\mu\text{m}$ vorlagen. Dies wurde gemacht, um zu gewährleisten, dass die folgenden Raman-Messungen auf verschiedenen Substraten an einzelnen Beads durchgeführt werden und damit untereinander auch vergleichbar sind. Unter gleichen Messbedingungen wurden Raman-Messungen an Proben auf den drei genannten Substraten durchgeführt. Die dazugehörigen Roh-Spektren sind in Abbildung 32 gezeigt. Da das Polystyrol eine stark ausgeprägte Raman-Signatur besitzt, war es möglich, auch auf einem BK7-Substrat Spektren aufzunehmen (s. Abb. 32, schwarz). Bis auf den Peak bei 1320 cm^{-1} sind alle Raman-Resonanzen detektierbar, wobei aufgrund der Nähe der Polystyrol-Partikel zur Substratoberfläche eine breite Fluoreszenzstruktur im Bereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} auftritt. Um die Vergleichbarkeit mit den anderen Spektren zu gewährleisten, wurde das Raman-Spektrum von Polystyrol-Beads auf BK7

mit 6 multipliziert (s. Abb. 32, schwarz gestrichelt). Das MgF_2 -Substrat hingegen zeichnet sich durch einen sehr geringen Untergrund, auch im Bereich zwischen 1300 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} aus (s. Abb. 32, grün). Die höchste Signalintensität lässt sich allerdings unter Verwendung eines planaren Spiegels als Substrats erreichen (s. Abb. 32, rot). Beispielsweise beträgt das Verhältnis der Raman-Peaks bei 1001 cm^{-1} für ein Spiegel- und MgF_2 -Trägermaterial $I(1001\text{ cm}^{-1})_{\text{Spiegel}} / I(1001\text{ cm}^{-1})_{\text{MgF}_2} \approx 4.6$. Diese Verstärkung lässt sich auf die nahezu 100-prozentige Rückreflexion sowohl des eingestrahlichten Laser- als auch des Raman-Lichts zurückführen. Es kommt zu einer Überlagerung des einlaufenden und reflektierten Lichts, wodurch eine Feldverstärkung erreicht wird. Dieser Effekt wird später in Kapitel 4.3 zur Verstärkung des Raman-Signals ausgenutzt.

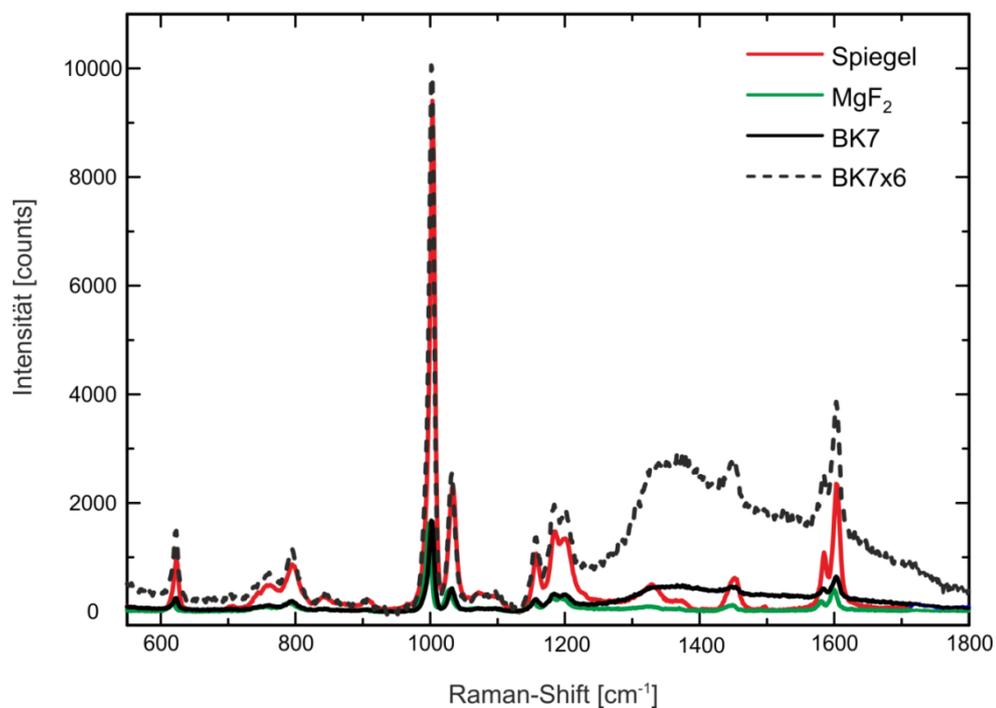


Abb. 32: Vergleich der Roh-Raman-Spektren von eingetrockneten Polystyrol-Kügelchen mit einem Durchmesser von $8\text{ }\mu\text{m}$ auf verschiedenen Substraten: auf planarem Spiegel (rot), MgF_2 (grün) und BK7 (schwarz). Das Spektrum auf dem BK7-Substrat wurde mit 6 multipliziert (schwarz gestrichelt). Die Spektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm , einer fokalen Leistung von 10 mW , einem $40\times$ Trockenobjektiv (NA 0.75) und einer Belichtungszeit von 2 s aufgenommen, wobei jedes Spektrum durch die Akkumulation von 3 einzelnen Spektren an derselben Stelle gebildet wird.

Anhand von Abbildung 32 lässt sich zusammenfassend sagen, dass MgF_2 -Substrate sich aufgrund ihres hintergrundarmen Signals sehr gut für die Untersuchung von schwachen Raman-Streuern, z. B. biologischen Proben, eignen. Für die Analyse eines eingetrockneten oder mit einer Spincoater aufgetragenen Films kommt auch ein planarer Spiegel als Substrat in Frage (vgl. Kap. 4.3). In der Regel weisen die herkömmlichen

Metallspiegel eine zusätzliche Schicht als Schutz gegen Oxidation auf, wobei diese Schicht je nach Zusammensetzung ein geringes bis kein Eigenspektrum besitzt.

Eine weitere Möglichkeit, den störenden Substratuntergrund bei Proben mit Abmessungen im μm -Bereich in wässriger Umgebung zu minimieren, besteht in der Verwendung der optischen Falle (vgl. Kap. 2.2.3). Dabei wird ein Objekt in einer gewissen Höhe über dem Substrat eingefangen, um an diesem dann Raman-Spektren aufzunehmen. In diesem Fall lassen sich auch BK7-Substrate verwenden. Dies wird im Folgenden anhand eines Polystyrol-Kügelchen-Wasser-Gemischs gezeigt (s. Abb. 33).

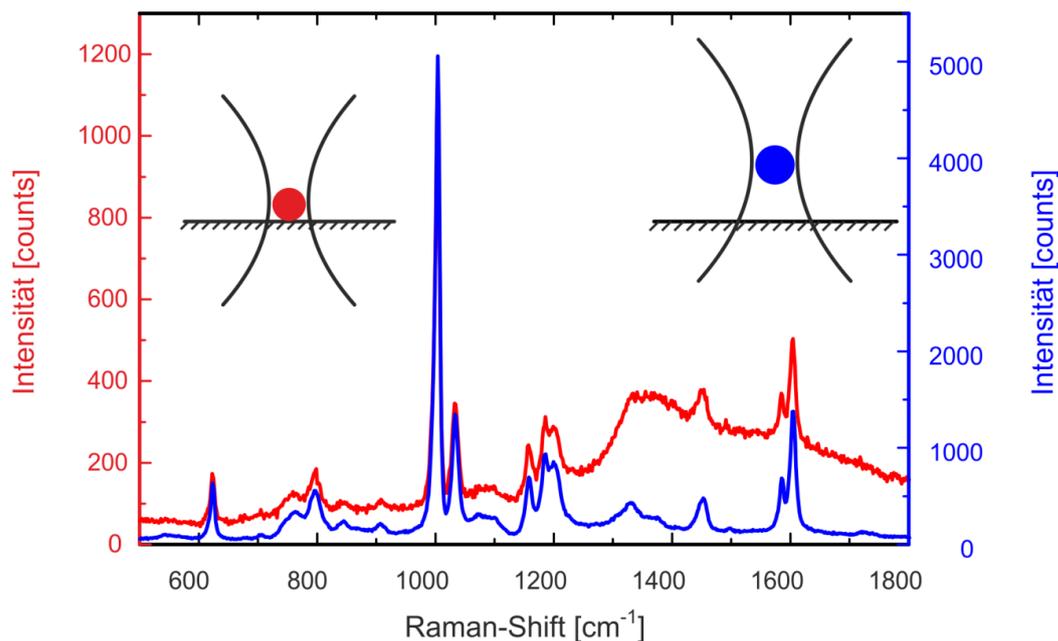


Abb. 33: Vergleich der Roh-Raman-Spektren eines $8\ \mu\text{m}$ großen Polystyrol-Kügelchens in Wasser auf einem BK7-Substrat. Die Spektren wurden mit einem $60\times$ Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2), einer Anregungswellenlänge von $785\ \text{nm}$, einer fokalen Leistung von $12\ \text{mW}$ und einer Belichtungszeit von $2\ \text{s}$ aufgenommen. Das Raman-Spektrum eines Kügelchens, das direkt auf der Oberfläche eines BK7-Substrates liegt, wird in rot gezeigt und das Raman-Spektrum eines Partikels, das sich in der optischen Falle in einer Höhe von $15\ \mu\text{m}$ über dem Substrat befindet, in blau. Während das blaue Spektrum aufgrund der Entfernung vom Trägermaterial nahezu untergrundfrei ist, tritt beim roten Raman-Spektrum ein breiter spektraler Fluoreszenzuntergrund des BK7-Substrats auf, der besonders stark im Bereich zwischen $1300\ \text{cm}^{-1}$ und $1800\ \text{cm}^{-1}$ ausgeprägt ist.

Finden die Raman-Messungen an Polystyrol-Kügelchen statt, die direkt auf der Oberfläche liegen, so tritt ein breiter störender Fluoreszenzuntergrund auf (s. Abb. 33, rot). Im Bereich zwischen $1300\ \text{cm}^{-1}$ und $1800\ \text{cm}^{-1}$ ist sein Beitrag besonders groß. Das Raman-Spektrum des Polystyrol-Kügelchens in der optischen Falle in einer Höhe von $15\ \mu\text{m}$ über dem BK7-Substrat zeichnet sich hingegen durch einen vernachlässigbar geringen Untergrund (s. Abb. 33, blau). Die Gegenüberstellung der beiden Spektren zeigt, dass ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch die Verwendung der optischen

Falle im Vergleich zum Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Beads, die sich direkt auf der Substratoberfläche befinden, erreicht werden kann. Des Weiteren lässt sich zum Beispiel der Raman-Peak bei 1320 cm^{-1} in der optischen Falle detektieren, während er bei Messung auf dem BK7-Substrat im Hintergrundsignal des verwendeten Substrats untergeht.

3.4 Mathematische Methoden der Datendarstellung

In diesem Kapitel werden zwei mathematische Methoden vorgestellt, welche für die nachfolgenden Raman-Messungen im Zuge der Nachbearbeitung zur Anwendung kamen. Im Kapitel 3.4.1 wird die Funktionsweise des Lieber-Algorithmus zur Entfernung des Fluoreszenzhintergrundsignals beschrieben. Im darauffolgenden Kapitel 3.4.2 wird ein multivariates Verfahren, die Hauptkomponentenanalyse, eingeführt. Im Rahmen dieser Arbeit kam dieses Verfahren zum Vergleich mehrerer ähnlicher Raman-Spektren zum Einsatz, um eventuell vorhandene Unterschiede zwischen einzelnen Spektren zu finden und diese einordnen zu können.

3.4.1 Lieber-Algorithmus zum Hintergrundabzug

Ohne zusätzliche Verstärkungsmechanismen wird die Raman-Analyse beispielsweise von biologischem Material oft durch die inhärente Autofluoreszenz von Biomolekülen und durch die Eigenfluoreszenz des verwendeten Trägermaterials signifikant erschwert. Zur Subtraktion des breitbandigen fluoreszenten Hintergrunds von den gemessenen unbehandelten Raman-Spektren können verschiedene mathematische Nachbearbeitungsmethoden eingesetzt werden (vgl. Kap. 2.2.3).

Die verbreitetsten davon basieren darauf, dass der Fluoreszenzuntergrund breitbandig und die Raman-Resonanzen hingegen meistens schmalbandig sind. Infolgedessen kann eine polynomielle Anpassung an die Form des Fluoreszenz-Signals durchgeführt werden, wobei das Polynom n -ter Ordnung P^n anschließend vom ursprünglichen Raman-Spektrum subtrahiert wird (s. Abb. 34, obere Bildhälfte). Am geeignetsten für die Fluoreszenz von biologischen Proben haben sich Polynome vierter oder fünfter Ordnung erwiesen [75]. Zur Anpassung der Polynomfunktion P^n an den Fluoreszenzuntergrund wird die Methode der kleinsten Quadrate verwendet: Die Summe der Quadrate der Differenz zwischen dem gemessenen und dem angepassten Untergrund wird durch die Variation der freien Parameter minimiert. Das heißt, die angepasste Kurve verläuft möglichst nah an den

gemessenen Datenpunkten. Die verbleibenden Abweichungen werden als Residuen bezeichnet und sind ein Kriterium für die Genauigkeit der durchgeführten Anpassung. Der große Nachteil nicht-automatisierter Polynom-basierter Methoden besteht darin, dass sie mit einem hohen Zeitaufwand verbunden sind und zu einer eher geringen Reproduzierbarkeit infolge der aktiven Beteiligung des Benutzers am Anpassungsprozess führen (wie z. B. durch die Wahl der Startparameter).

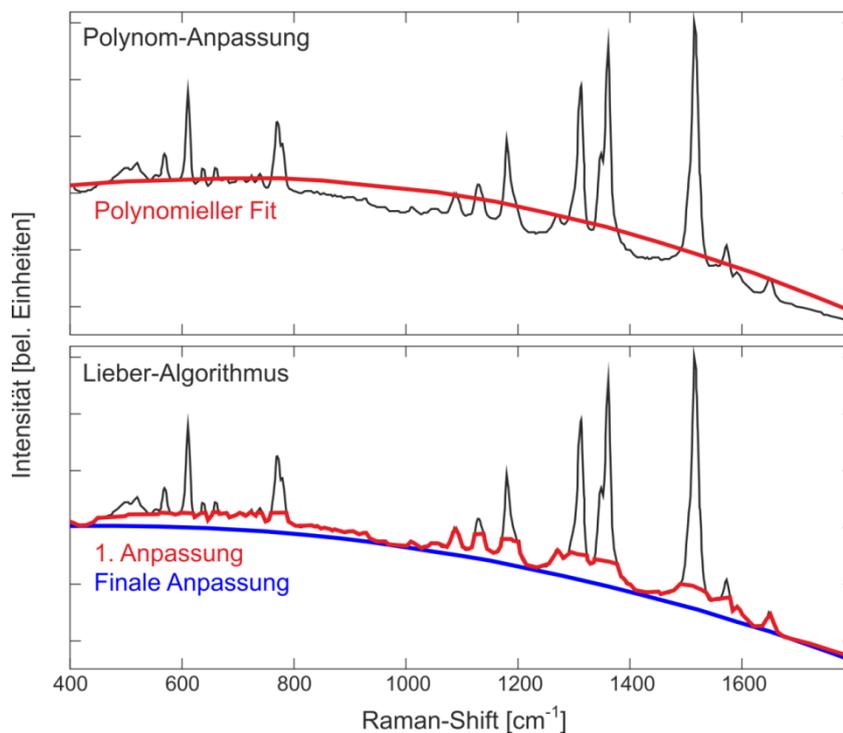


Abb. 34: Funktionsweise des automatisierten Lieber-Algorithmus im Vergleich zur nicht-automatisierten Polynom-Anpassung am Beispiel von Rhodamine 6G. In der oberen Bildhälfte ist ein Roh-Raman-Spektrum (schwarz) dargestellt, in dem der breitbandige Fluoreszenzuntergrund durch einen polynomiellen Fit in Kombination mit der Methode der kleinsten Quadrate (rot) angenähert wird. In der unteren Bildhälfte dagegen wird die Kurvenanpassung des Untergrunds nach 2 Iterationen des Lieber-Algorithmus dargestellt. In rot wird das Ergebnis des ersten Durchlaufs des Algorithmus und in blau die resultierende Fluoreszenz-Basislinie dargestellt (adaptiert aus [75]).

Eine Anwendungsoptimierung der polynomiellen Anpassungsmethoden stellt der automatisierte Lieber-Algorithmus dar [75], der in dieser Arbeit für die Nachbearbeitung der Raman-Spektren zum Einsatz kommt. Der Algorithmus wurde im Rahmen der Masterarbeit von Lena Nolte in eine MatLab-Routine implementiert [102].

Der automatisierte Lieber-Algorithmus basiert ebenfalls auf der Kombination einer polynomiellen Kurvenanpassung mit der Methode der kleinsten Quadrate, um eine Fluoreszenz-Basislinie zu bestimmen, die im darauffolgenden Schritt vom Rohspektrum abgezogen werden kann (s. Abb. 34, untere Bildhälfte). Im Unterschied zu nicht-automatisierten Methoden werden beim Lieber-Algorithmus die Raman-Peaks aus dem

Roh-Spektrum schrittweise eliminiert: Als Erstes wird ein polynomieller Fit fünfter Ordnung P^5 basierend auf der Methode der kleinsten Quadrate ausgeführt, der die Form des breiten Fluoreszenz-Signals ansatzweise nachbildet. So wird der erste Satz von Datenpunkten für die weiteren Iterationen generiert.

Daraufhin erfolgt der Vergleich der Intensitäten in der Anpassungskurve und im Originalspektrum Datenpunkt für Datenpunkt. Wenn der Datenpunkt im Roh-Spektrum einen kleineren Wert als der korrespondierende Datenpunkt der Anpassungskurve hat, dann wird der kleinere Wert aus dem Rohspektrum in der Anpassungskurve ersetzt. Besitzt der Datenpunkt hingegen einen größeren Wert im Originalspektrum als im Fit, dann wird der dazugehörige Wert der Anpassungskurve beibehalten.

Nach dem ersten Durchlauf $i = 1$ entsteht eine neue Anpassungskurve $P^5(i = 1)$, die im zweiten Iterationsschritt ebenfalls durch den Abgleich der Punkte im Originalspektrum und in der Fit-Kurve zu einer neuen Polynomfunktion $P^5(i = 2)$ angepasst wird. Auf diese Weise werden die neuen Datenpunkte für die nächsten Durchläufe vom Fit selbst iterativ generiert. Der Algorithmus wird so lange ausgeführt, bis alle Raman-Resonanzen aus dem Originalspektrum herausgefiltert sind oder bis alle Intensitätswerte in der generierten Kurve gleich oder kleiner sind, als die Intensitäten im korrespondierenden Spektrum (s. Abb. 34, untere Bildhälfte, blaue Kurve).

In der Regel sind etwa 25-200 Iterationen notwendig, um die im Roh-Spektrum auftretenden Raman-Peaks optimal zu eliminieren. Der iterative Aufwand und das Endergebnis der Untergrundsubtraktion hängen dabei vom jeweiligen Raman-Spektrum bzw. dem Fluoreszenz-Raman-Signal-Verhältnis ab. An dieser Stelle ist anzumerken, dass der Lieber-Algorithmus trotz seiner offensichtlichen Vorteile bei sehr verrauschten Spektren und Spektren mit verschiedenen Artefakten keine zuverlässigen Daten liefert.

3.4.2 Hauptkomponentenanalyse zur Reduktion und Klassifizierung mehrdimensionaler Datensätze

Die Visualisierung multivariater Datensätze wird mit zunehmender Anzahl der Variablen zur Herausforderung. Aus diesem Grund werden multivariate Analysemethoden eingesetzt, um die Reduktion umfangreicher Originaldaten mit minimalen Informationsverlusten zu erreichen und zugleich die gegenseitige Beziehung mehrerer Variablen zueinander zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine im Rahmen der Masterarbeit von Lena Nolte [102] geschriebene MatLab-basierte Hauptkomponentenanalyse-Routine zur Auswertung der experimentellen Daten benutzt (s. Kap. 4.2.5). Unter Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis, PCA*) versteht man eine Methode der multivariaten

Statistik zur Vereinfachung und Veranschaulichung größerer und mehrdimensionaler Datensätze, die 1901 vom britischen Mathematiker Karl Pearson formuliert wurde [103]. Die wichtigsten Anwendungen der PCA bestehen in erster Linie in der Reduktion mehrdimensionaler Daten, Identifizierung von abhängigen Variablen und Mustererkennung in Datensätzen.

In Bezug auf spektroskopische Daten kann man sich den auszuwertenden Datensatz folgendermaßen vorstellen: Wird nur der relevante Fingerabdruck-Bereich eines Raman-Spektrums zwischen 500 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} betrachtet, so erhält man 1300 Einzelwerte pro Spektrum. Dies entspricht der Anzahl der Variablen eines Objekts. Werden beispielsweise 10 Spektren aufgenommen, so sind es schon 13,000 Messwerte, die die Anzahl der Variablen von 10 Objekten widerspiegeln.

Diese Daten können als Matrizen geschrieben werden, wobei die Zeilen die Objekte und die Spalten die Variablen enthalten. Die Beziehungen zwischen Variablen können durch eine Kovarianzmatrix vollständig beschrieben werden, in der die Diagonalelemente die Varianzen einzelner Variablen und die Außerdiagonalelemente die Kovarianzen zwischen allen möglichen Paaren von Variablen darstellen. Als Varianz bezeichnet man dabei die Streuung einer Variablen in Bezug auf den Mittelwert der Datenpunkte und die Kovarianz ist ein Maß für den linearen Zusammenhang von zwei Variablen. Letztere gibt also an, ob ein höherer Wert einer Variablen mit einem höheren oder niedrigeren Wert einer zweiten Variablen korreliert. Die Lösung des Eigenwertproblems der Kovarianzmatrix liefert die sogenannten Hauptkomponenten (engl. *Principal Component, PC*), die anschließend in einem auf die PCs projizierten Koordinatensystem dargestellt werden. Unter PCs versteht man eine Linearkombination aller beobachteten, aber unterschiedlich gewichteten Variablen, die nach fallender Varianz (also nach abnehmenden Informationsgehalt) geordnet sind. Dabei ist die Varianz ein Maß für den Informationsgehalt der jeweiligen Hauptkomponente. Die Eigenvektoren der Kovarianzmatrix bilden die PCs und somit die Achsen des neuen Koordinatensystems. Die dazugehörigen Eigenwerte geben den Informationsgehalt in den einzelnen PCs an und korrespondieren also zur Varianz entlang der neuen Achsen. Die Anzahl der PCs stimmt mit der Anzahl der beobachteten Variablen überein, die einzelnen PCs sind orthogonal zueinander und damit unabhängig voneinander. Eine genauere mathematische Beschreibung der Hauptkomponentenanalyse kann beispielsweise [104] entnommen werden.

Um die Funktionsweise der PCA anschaulich darzustellen, wurden Polystyrol-Spektren gemessen und so verändert, dass zwei Gruppen von jeweils 15 Spektren entstehen: Für die erste Gruppe wurde eine kleine Streuung der Intensität des 1001 cm^{-1} -Peaks eingeführt, während in der zweiten Gruppe eine große Streuung der Intensität des gleichen Peaks eingeführt wurde. Die Mittelwertsspektren der Gruppen sind in Abbildung 35a gezeigt, wobei der Unterschied in der Intensität des 1001 cm^{-1} -Peaks ca. 240 counts beträgt. Es wird der Wellenzahlbereich zwischen 500 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} betrachtet, d. h. es gibt 30 Objekte mit insgesamt 39,000 Variablen.

In Abbildung 35b ist das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse durch Auftragung von PC1 gegen PC2 gezeigt. Dabei gilt: Je näher sich die Punkte sind, desto ähnlicher sind sie. In der genannten Abbildung lassen sie sich zu zwei räumlich voneinander separierten Datenpunktwolken zusammenfassen (s. Abb. 35b, rote und grüne Datenpunktwolke).

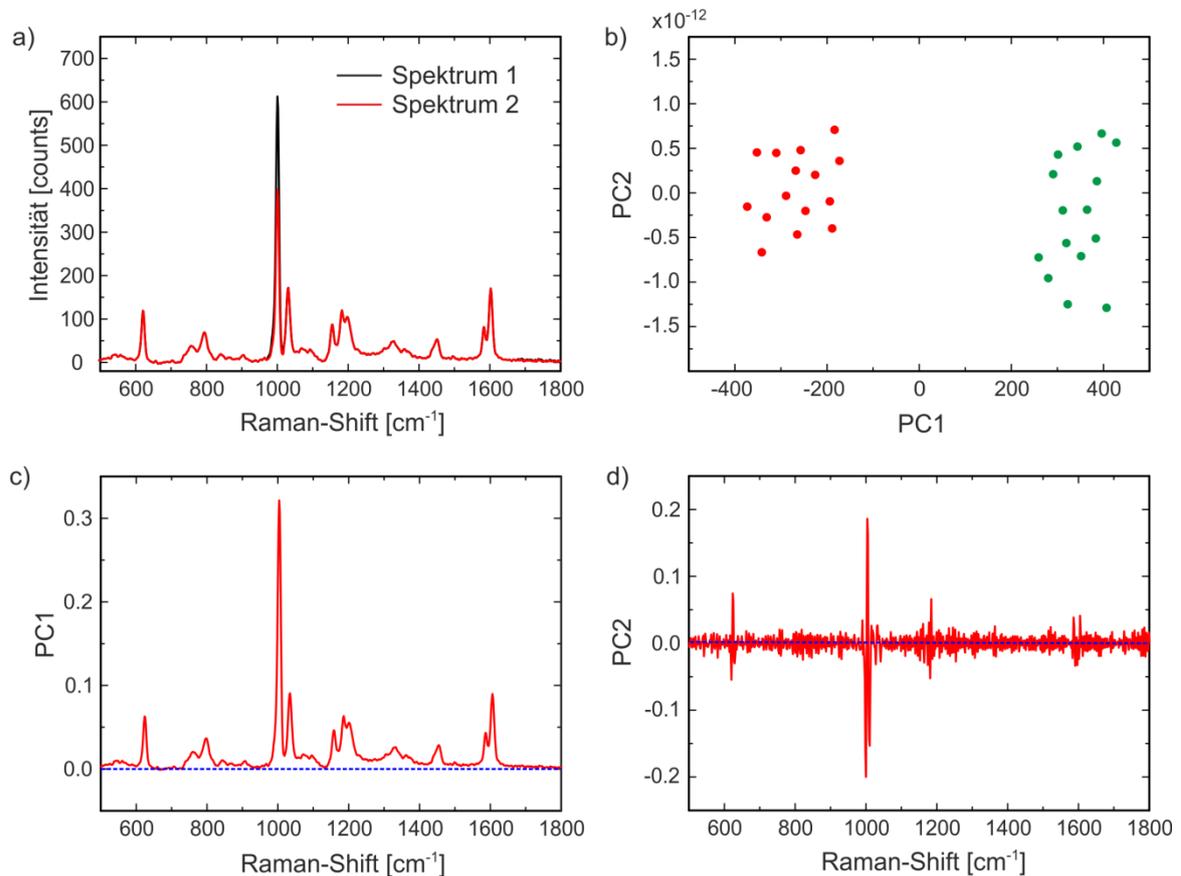


Abb. 35: Darstellung der PCA-Funktionsweise anhand eines künstlich erzeugten Datensatzes, der aus 30 einzelnen Raman-Spektren besteht. Dabei handelt sich um ein Polystyrol-Spektrum, bei dem die Intensität des Peaks bei 1001 cm⁻¹ in jedem Spektrum in unterschiedlichem Maße variiert wurde. Dies ist exemplarisch für zwei Raman-Spektren in a) gezeigt (Spektrum 1, schwarz und Spektrum 2, rot). b) zeigt das Endergebnis der PCA. Dabei bilden sich zwei räumlich voneinander separierte Datenpunktwolken (rot und grün). c) und d) zeigen die zu PC1 und PC2 zugehörigen Loading-Plots. Übersichtshalber wurde die Nullpunktlinie als eine blau gestrichelte Linie eingezeichnet. In c) handelt es sich beim gezeigten Spektrum um den Loading-Plot von PC1, der gleichzeitig das Mittelwertsspektrum ist. In d) wird der Loading-Plots von PC2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die zweite Hauptkomponente in erster Linie durch den Peak bei 1001 cm⁻¹ geprägt ist, dessen Intensität bei 30 Spektren variiert wurde.

Selbst wenn es möglich ist, das Ausgangsvariablenset auf wenige voneinander unabhängige Komponenten zu reduzieren, sind diese für die Auswertung allerdings nur dann wertvoll, wenn ihre Beziehung zu den einzelnen Variablen geklärt wurde. Dies geschieht durch die Betrachtung der sogenannten Loading-Plots, in denen die Anteile der einzelnen Variablen an der Hauptkomponente (Korrelationskoeffizienten zwischen den

Komponenten und den einzelnen Variablen oder Loadings) im ursprünglichen Koordinatensystem dargestellt sind (hier: gegen die Raman-Verschiebung aufgetragen) (s. Abb. 35c, d). Wenn sich die Anteile aller Variablen zu PC oberhalb der Nullpunktlinie befinden, dann handelt es sich bei dieser PC um den Mittelwert aller Variablen (s. Abb. 35c). Liegen im Loading-Plot sowohl positive als auch negative Beiträge der einzelnen Variablen vor, so lässt sich von diesen Ausschlägen auf den Zusammenhang der Variablen mit der jeweiligen PC schließen (s. Abb. 35d). Die Werte, die auf der Nullpunktlinie liegen, weisen keine Korrelation mit der betrachteten PC auf. Positive Beiträge bedeuten, dass der Wert der jeweiligen Variablen in Richtung dieser Hauptkomponente zunimmt, bei negativen Beiträgen fällt er.

Des Weiteren wird durch die Überprüfung der Loading-Plots vermieden, dass das Rauschen zur Bewertung herangezogen wird: Mit jeder Komponente nimmt die Gesamtvarianz ab und bei höheren PCs bleibt nur noch das Rauschen übrig. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 über 90% der Gesamtvarianz der Variablen erklären, wobei die PC1 in der Regel der Mittelwert aller Variablen darstellt [105].

4 Ergebnisse

Die Raman-Spektroskopie ist eine wichtige Methode zur Charakterisierung und Identifizierung von verschiedensten Substanzen. Dabei wird ausgenutzt, dass jede Substanz eine einzigartige Signatur im Raman-Spektrum aufweist. Zur Detektion des schwachen Raman-Signals wird ein konfokales Raman-Spektrometer mit verschiedenen Anregungswellenlängen und einer Raster-Scanfunktion eingesetzt. Dessen Aufbau wurde im vorausgegangenen Kapitel 3.1 vorgestellt. Darüber hinaus wurden die mathematischen Methoden zum Abzug des Hintergrundsignals und zur Reduktion multidimensionaler Datensätze aufgezeigt (vgl. Kap. 3.4). Unter Verwendung des aufgebauten Raman-Spektrometers wurden Raman-Messungen an verschiedenen biologischen und organischen Systemen durchgeführt. Diese unterscheiden sich grundlegend in ihrer Größe, Raman-Aktivität und der Menge an Raman-aktiven Molekülen. Besonders eine geringe Menge Raman-aktiver Substanzen im Anregungsvolumen von nur noch wenigen Molekülen stellt dabei eine Herausforderung an den Versuchsaufbau dar.

In Kapitel 4.1 erfolgen Raman-Messungen an humanen Aorta-Schnitten, die überwiegend infolge der Lipideinlagerung in die Gefäßwand krankhafte Veränderungen aufweisen. Es wird überprüft, ob die spontane Raman-Spektroskopie durch die Identifizierung von endogenen biochemischen Markern für kardiovaskuläre Erkrankungen die etablierten Diagnostikmethoden sinnvoll erweitern kann.

Anschließend werden einzellige Mikroalgen untersucht, die aufgrund ihrer hohen Lipid-Produktivität eine potentielle Energiequelle für die Biotechnologie sein könnten (s. Kap. 4.2). Im Rahmen dieses Projekts wird die chemische Zusammensetzung von Lipid-Ansammlungen innerhalb einzelner Zellen in Abhängigkeit von wachstumsfördernden Faktoren bestimmt.

Im darauffolgenden Kapitel erfolgen Raman-Messungen an noch kleineren Systemen, organischen Schichten mit Schichtdicken im Bereich von wenigen Nanometern hin bis in den Subnanometer-Bereich (s. Kap. 4.3). Bei derart dünnen Filmen benötigt man zusätzliche Methoden (hier: eine optische Kavität), um eine detektierbare Intensität des Raman-Signals zu generieren.

Anschließend werden organische molekulare Systeme analysiert, die sich zwischen zwei plasmonengekoppelten Nanopartikeln befinden und unter Beleuchtung eine Nahfeldverstärkung erfahren (s. Kap. 4.4). Diese hängt unter anderem von der Anregungswellenlänge ab. Infolgedessen wird die Raman-Verstärkung in Bezug auf eine resonante und nicht-resonante Anregung hin untersucht.

4.1 Identifizierung von Atherosklerose-Markern in humanen Aorta-Gewebeschnitten

Im folgenden Kapitel werden Raman-Messungen an humanen Aorta-Gewebeschnitten, die krankhafte Veränderungen der Gefäßwand aufweisen, vorgestellt. Der Thematik zugrundeliegende medizinische und physikalische Fragestellungen werden in Kapitel 4.1.1 erläutert. Im darauffolgenden Kapitel 4.1.2 erfolgt die Beschreibung des Aufbaus von Arterien, die notwendig für das Verständnis der Entstehung atherosklerotischer Erkrankungen ist. In Kapitel 4.1.3 wird der aktuelle Stand der Medizin zur Identifizierung und Charakterisierung von atherosklerotischen Formationen in den Blutgefäßen vorgestellt. Auf die Probenpräparation und Vorcharakterisierung der analysierten Aorta-Gewebeschnitte wird in den Kapiteln 4.1.4 und 4.1.5 eingegangen. Daraufhin werden die an den histologischen Schnitten durchgeführten Raman-Messungen in Kapitel 4.1.6 beschrieben. Anschließend werden in Kapitel 4.1.7 die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst.

4.1.1 Motivation

Unter kardiovaskulären Krankheiten versteht man progressive Erkrankungen vom Herzen und den Herzkranzgefäßen (den sogenannten Koronarien), die oft als Folgeerscheinungen einer Atherosklerose entstehen. Als Atherosklerose bezeichnet man die fortschreitende Verengung und Verhärtung von Arterieninnenwänden durch Ablagerungen von Lipiden und Blutbestandteilen [106].

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache für den Menschen dar: Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation sind allein im Jahr 2012 weltweit 17.5 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen gestorben. Dies entspricht ca. 31% der globalen krankheitsbedingten Todesfälle. Davon entfallen 7.4 Millionen auf koronare Herzkrankheiten und 6.7 Millionen auf Schlaganfälle [14].

Die klinischen Beschwerden der atherosklerotisch bedingten Erkrankungen machen sich oft erst spät bemerkbar. Dementsprechend werden sie in der Regel bereits in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Um ein Fortschreiten der festgestellten Erkrankung zu verzögern oder zu verhindern, muss eine geeignete Therapie angewandt werden. Diese variiert von Patient zu Patient und hängt vor allem vom vorliegenden Krankheitsbild ab. Heutzutage gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Untersuchungsverfahren zur Bestimmung und Charakterisierung des Krankheitsstadiums und damit auch des Krankheitsbildes [15], [107].

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen bildgebenden und Biopsie-Methoden, die in Kapitel 4.1.3 genauer beschrieben werden. Die etablierten bildgebenden Verfahren, wie intravaskulärer Ultraschall oder optische Kohärenztomographie, eignen sich zur Erkennung von neoplastischen (krankhaften) Strukturen und damit zur Klassifizierung von unterschiedlichen Stadien der Atherosklerose [108]. Sie liefern jedoch keine Informationen über die biochemische Zusammensetzung des betroffenen Gewebes, die für die weitere therapeutische Vorgehensweise von Bedeutung wären.

Von den Biopsie-Verfahren ist die sogenannte H&E-Übersichtsfärbung² am weitesten verbreitet. Sie dient ebenfalls der Stadieneinteilung von atherosklerotischen Läsionen und liefert auch keine Informationen über die molekulare Struktur der vorliegenden Probe. Außerdem hängt die „Qualität“ der Auswertung von der Erfahrung des zuständigen Pathologen ab [15].

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des operativ entnommenen Gewebes ist die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektroskopie in Kombination mit einem Flugzeitmassenspektrometer (s. Kap. 4.1.3). Dabei handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren, bei dem die Verteilung bestimmter Substanzen (z. B. Lipide oder Proteine) innerhalb der zu untersuchenden Probe, ähnlich wie bei CARS (s. Kap. 2.2.2), orts aufgelöst dargestellt wird. Dabei geht den materialverbrauchenden Messungen eine aufwendige Probenpräparation voraus [109]–[111].

Im Unterschied zu den oben genannten Untersuchungsmethoden liefert die berührungslose Raman-Spektroskopie Informationen über die biochemische Zusammensetzung der zu analysierenden Substanz und bedarf darüber hinaus keiner aufwendigen Probenpräparation [6], [9], [28]. Durch die Strukturbestimmung atherosklerotischer Aorta-Bereiche wäre es möglich, präzisere Diagnosen zu erstellen und eine personalisierte Therapie anzuwenden. Im Folgenden wird gezeigt, wie die spontane Raman-Spektroskopie die bereits etablierten Diagnostikmethoden sinnvoll ergänzen kann. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse von humanen Aorta-Gewebeschnitten von Patienten, bei denen aufgrund einer fortgeschrittenen, akuten Herzinsuffizienz eine Herztransplantation vorgenommen werden musste. In der Regel waren dies Patienten in hohem Alter, so dass das Gewebe deutliche Anzeichen von Atherosklerose in verschiedenen Stadien aufwies.

² Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung

4.1.2 Aufbau von Arterien und Entstehungsmechanismus der Atherosklerose

Im Folgenden wird eine Einführung in die Pathogenese einer typischen kardiovaskulären Erkrankung gegeben. Dazu wird vorerst der genaue Aufbau von Arterien erläutert und anschließend die klinische Definition der Atherosklerose vorgestellt.

Aufbau von Arterien

Koronararterien, wie auch andere mittelgroße und große Transportgefäße, sind röhrenartige Hohlkörper, die aus 3 koaxialen Gewebeschichten bestehen: *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* (s. Abb. 36).

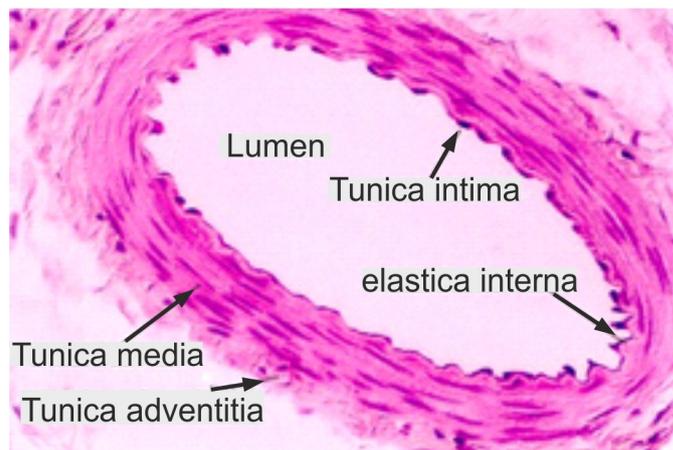


Abb. 36: Histologischer Schnitt einer Koronararterie mit der typischen H&E-Färbung. Der dreischichtige Aufbau eines Blutgefäßes von innen nach außen: Gefäßlumen, *Tunica intima*, *elastica interna*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* (adaptiert aus [112]).

Je nach Funktion des Blutgefäßes sind diese Schichten unterschiedlich stark ausgeprägt:

- Die innere Gefäßwandschicht wird als *Tunica intima* bezeichnet. Sie ist nur wenige Mikrometer dick und besteht aus einschichtigem Endothel, das die direkte Barriere zum Blut darstellt, und einer darunterliegenden subendothelialen Bindegewebsschicht *Stratum subendotheliale* mit einer Basalmembran. Vereinzelt lassen sich hier auch glatte Muskelzellen finden. Zu der *Tunica intima* zählt auch die sogenannte *elastica interna* (elastische Membran), die die Grenze zur *Tunica media* bildet. Die Hauptaufgabe der inneren Schicht besteht in der Regulierung des Stoffaustausches zwischen dem Blutstrom und der Arterienwand [113].
- Die mittlere Schicht heißt *Tunica media* und macht etwa 90% der gesamten Arterienwanddicke aus. Die *Media* ist aus ringförmig verlaufenden Muskelfasern aufgebaut. Aufgrund der Elastizität der glatten Muskulatur ist diese Schicht für die

Gefäßmotorik verantwortlich: Sie passt sich den Blutdruckänderungen an. Ähnlich wie bei der *Tunica intima* kann auch die mittlere Gefäßwandschicht durch eine elastische Membran, *elastica externa*, nach außen hin umgeben sein. Diese Schicht aus elastischen Fasern ist allerdings nicht so dicht, wie die *elastica interna*. Dementsprechend ist die Abgrenzung zwischen der *Media* und der außen befindlichen *Adventitia* nicht so scharf, wie die Grenzzone zwischen der *Intima* und der *Media* [114].

- Die äußere Gefäßwandschicht wird *Tunica adventitia* genannt. Sie besteht ebenfalls aus glatter Muskulatur und lockerem Bindegewebe (Kollagen), das mit kleineren Blutgefäßen (*Vasa vasorum*) zur Blutversorgung der Arterie und mit feinen Nervensträngen des autonomen Nervensystems versehen ist. Die Kollagenschicht im Bindegewebe sorgt für die Verankerung der Arterie in ihrer Umgebung [113].

Atherosklerose: Definition, Entstehung und Risikofaktoren

Laut der offiziellen Definition der Weltgesundheitsorganisation aus dem Jahr 1958 versteht man unter der Atherosklerose eine „variable Kombination von *Intima*-Veränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (s. Abb. 37) [114].

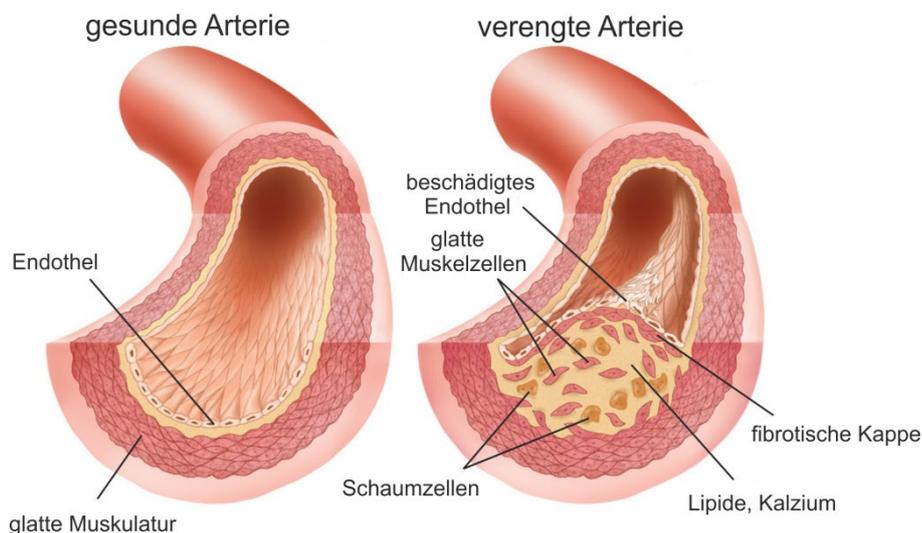


Abb. 37: Schematische Darstellung einer gesunden (links) und einer aufgrund der Atherosklerose verengten humanen Arterie (rechts). Die gesunde Gefäßwand zeichnet sich durch eine intakte Endothelzellschicht der *Intima* aus. Infolge der Schädigung des Endothels und der damit verbundenen progressiven Einlagerung von primär Lipiden und Blutbestandteilen in die Gefäßwand entwickelt sich eine Verdickung des betroffenen Gefäßabschnitts. Diese führt im späteren Verlauf zur Verengung der Arterie (adaptiert aus [120]).

Diese krankhaften Veränderungen der Arterien führen zu deren zunehmenden Verhärtung und Verkalkung. Wird die signifikant verengte Arterie beispielsweise von einem Blutgerinnsel verschlossen, so kann dies folgenschwere kardiovaskuläre Ereignisse, wie einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall, zur Folge haben [115].

Trotz intensiver Forschung bleibt der genaue Entstehungsmechanismus der Atherosklerose immer noch nicht vollständig verstanden [115]. Momentan geht man aber von der „response-to-injury“-Hypothese aus, die 1976 von Russel Ross aufgestellt wurde [116]. Sie besagt, dass die Atherosklerose als Folge endothelialer Schädigung und der damit einhergehenden Veränderungen der Blutgefäße entsteht.

Das einschichtige Endothel bildet eine Barriere zwischen Blutstrom und Arteriengewebe, die das Eindringen von Blut und Blutbestandteilen in den subendothelialen Bereich verhindert. Darüber hinaus sorgt die Endothelzellschicht durch kontinuierliche Produktion von verschiedenen „Schutz“-Substanzen, z. B. Stickstoffmonoxid, dafür, dass Blutzellen an den Gefäßwänden nicht anhaften. Die durch externe Einflüsse ausgelöste Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthese äußert sich wiederum in einer Herabsetzung der antiadhäsiven Wirkung der Endothelzellen und damit in ihrer Funktionsstörung. Die endotheliale Schädigung führt ihrerseits zur Erhöhung der Permeabilität des Endothels u. a. für schädliche Lipoproteine geringer Dichte (engl. *Low Density Lipoproteins, LDL*) und Lipoproteine sehr geringer Dichte (engl. *Very Low Density Lipoproteins, VLDL*), die sich in der Blutbahn befinden [117], [118]. Dabei handelt es sich um primär gesättigte und modifizierte Fettsäuren, die vor allem in industriell hergestellter, lange haltbarer Nahrung vorkommen. Die endotheliale Dysfunktion kann aber auch mechanisch (durch hohe Scherkräfte bei Hypertonie oder an den Gefäßverzweigungen etc.), toxisch (durch Toxine des Tabakrauchs oder durch Bakterien etc.), sowie altersbedingt hervorgerufen werden [119].

Nach der Akkumulation von LDL und VLDL in einer vorgeschädigten *Intima* werden diese dort beispielsweise durch oxidative Prozesse modifiziert. Als Reaktion auf oxidativen Stress werden chemische und immunologische Reaktionen ausgelöst. Infolgedessen tritt eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen in den Endothelzellen auf. Als Zytokine werden Entzündungsmarker bezeichnet, die wiederum von Immunzellen im Blut, primär Monozyten, als Botenstoffe genutzt werden, um einen Entzündungsherd zu identifizieren [121]. Die gleichzeitige Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen ermöglicht die Anheftung von chemotaktisch angelockten Monozyten, aber auch von Blutfetten an die *Intima* mit der darauffolgenden Einlagerung in den Subendothelialraum. Dort induzieren die freigesetzten Zytokine mit der Zeit die Differenzierung von Blutmonozyten zu Makrophagen, welche zu Beginn die Schutzfunktion des Arteriengewebes erfüllen: Sie nehmen mit Hilfe des Scavenger-Rezeptors schädliche LDL auf und geben sie an die zu LDL antagonistischen Lipoproteine hoher Dichte (engl. *High Density Proteins, HDL*) weiter. Letztere modifizieren überschüssiges Cholesterin und transportieren es zum Abbau zur Leber [122].

Die vermehrte und unregulierte Aufnahme von schädlichen Lipoproteinen führt zur Überladung von Makrophagen. Diese werden mit ihren zahlreichen Lipidvakuolen zu sogenannten Schaumzellen, die sich in der *Intima* und zum Teil in der *Media* akkumulieren und die Vorläufer der ersten atherosklerotischen Läsionen sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass die Schaumzellen sowohl aus Lipid-Tröpfchen als auch aus den aus der *Media* eingewanderten glatten Muskelzellen bestehen [123].

Infolge der Apoptose wird aus absterbenden Schaumzellen deren Zellinhalt (überwiegend oxidierte LDL und Cholesterinester) freigesetzt. Diese Lipide, Makrophagen und nekrotische Zellfragmente bilden den Kern krankhafter Gefäßwandverdickungen, sogenannter atherosklerotischer Plaques. Dahingegen werden fibröse kollagenreiche Plaquekappen von aus der *Media* migrierten glatten Muskelzellen und extrazellulären Matrixzellen geformt. Die Größe und die Zusammensetzung variieren von Plaque zu Plaque. Abhängig von der Größe können atherosklerotisch bedingte Arterienverdickungen den Blutfluss im betroffenen Gefäßabschnitt im unterschiedlichen Maße behindern. Unter Umständen kann dies folgenschwere kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen. Im schlimmsten Fall brechen die Plaques auf und deren Inhalt führt einen thrombogenen Arterienverschluss herbei [117], [119], [124].

Demzufolge ist eine Unterscheidung von Plaques im Hinblick auf ihre Stabilität sinnvoll [124]. Stabile Plaqueformationen zeichnen sich durch einen kleinen Lipidkern mit einer dicken fibrösen (kollagenhaltigen) Kappe aus, welche die Plaque stabilisiert. Dadurch weisen sie ein geringes Risiko für Akutereignisse auf. Im Laufe der Zeit gewinnen die Plaques zwar an Durchmesser und behindern infolgedessen den Blutstrom, bleiben aber in ihrer Gesamtheit intakt.

Instabile Plaques hingegen besitzen einen großen Lipidkern und eine dünne, fragile Plaquekappe, die spontan aufreißen kann. Tritt eine Plaqueruptur auf, so kommt es zum direkten Kontakt zwischen dem Plaqueinhalt und dem Blut. Diese Interaktion führt zur Aktivierung von Blutgerinnungsmechanismen und zur anschließenden Verstopfung der Herzkranzgefäße, die ihrerseits ein kardiovaskuläres Ereignis, wie z. B. einen Herzinfarkt, auslösen kann [125]. Das Risiko einer Ruptur hängt von verschiedenen Faktoren ab, z. B. von der biochemischen Komposition der jeweiligen Plaque, deren Volumen, Lokalisation oder Stabilität der fibrösen Kappe gegenüber von mechanischem Stress (Scherkräften oder Dehnung der Gefäßwand) [126].

In Hinsicht auf die Plaquemorphologie erfolgt außerdem die Differenzierung zwischen kalzifizierten und nicht-kalzifizierten Plaques. Die kalzifizierten Läsionen weisen einen hohen Anteil an Kalziumsalzen (Kalziumphosphat und Kalziumcarbonat) auf [127]-[129]. Die pathologischen Kalzifizierungen führen zur Gefäßwandstarre und dementsprechend zur Minderung der kontraktile Fähigkeit des betroffenen Arterienabschnittes mit daraus resultierenden Durchblutungsstörungen.

In Bezug auf den Entstehungsort unterscheidet man des Weiteren zwischen *Intima*- und *Media*-Verkalkungen, die aber auch in Kombination miteinander auftreten können [129]. Während die *Media*-Verkalkungen (Mönckeberg-Mediasklerose) sich unabhängig von der Atherosklerose ausbilden und durch die Einlagerung von Kalziumapatit-Kristallen zwischen elastischen Fasern und glatten Muskelzellen charakterisiert sind, stellen die Kalziumablagerungen der *Intima* eine Folgeerscheinung der Atherosklerose dar [127]. Der genaue Entstehungsmechanismus der „Verkalkung“ der Blutgefäße ist immer noch nicht komplett bekannt [108]. Nach dem heutigen Kenntnisstand geht man aber davon aus, dass die Mineralisierung überwiegend von apoptotischen glatten Muskelzellen und deren Überresten herbeigeführt wird. Die Zellen zerfallen in Apoptosekörperchen (mit einer Membran umfüllte Zellfragmente), die normalerweise durch benachbarte Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden. Findet die Phagozytose nicht statt, so treten Verkalkungserscheinungen vorhandener Plaques auf [108].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der lokale Arterienradius sich infolge der Bildung und Akkumulation von atherosklerotischen Läsionen zunehmend reduziert. Dies hat eine Erhöhung des Blutdruckes auf die betroffene Arterienwand zur Folge. Die oben beschriebenen Veränderungen der Gefäßwände erfolgen normalerweise schleichend über einen längeren Zeitraum von mehreren Jahren oder sogar Jahrzehnten, oft auch symptomlos.

Es gibt eine Reihe von Risikofaktoren, die zum Ausbruch der atherosklerotisch bedingten Erkrankungen und/oder zur weiteren Verschlechterung des Gesundheitszustandes führen können. Hierbei muss zwischen reversiblen (Fettleibigkeit, Rauchen, Alkoholkonsum, Stress, Bewegungsmangel etc.) und irreversiblen Faktoren (genetische Prädisposition in Form von Hypertonie oder Diabetes, fortschreitendes Alter etc.) unterschieden werden [130]. Die ersteren lassen sich durch einen gesundheitsbewussten Lebensstil minimieren bzw. vermeiden, die letzteren sind genetisch bedingt und lassen sich nicht mehr beeinflussen. Die oben aufgeführten Risikofaktoren und vor allem deren Kombination erhöhen zwar die Wahrscheinlichkeit koronarer Herzkrankheiten, aber kardiovaskuläre Ereignisse können auch ohne deren Vorliegen auftreten [119].

4.1.3 Etablierte Diagnostikmethoden zur Charakterisierung von atherosklerotischen Plaques

Libby et. al haben bereits gezeigt, dass die Stabilität atherosklerotischer Plaques und damit auch deren Gefahrenpotenzial in hohem Maße von deren Zusammensetzung abhängen [131]. Vor allem ist die Unterscheidung zwischen stabilen und instabilen Plaques besonders wichtig für die therapeutische Vorgehensweise. Bei instabilen Formationen besteht ein hohes Rupturrisiko und dementsprechend ein akuter

Handlungsbedarf. Stabile Plaques hingegen können sich im Laufe der Zeit sowohl zu instabilen Läsionen entwickeln oder sich bis zu einem gewissen Grad zurückbilden [132].

Da die Komposition von atherosklerotischen Läsionen und deren Morphologie von Patient zu Patient und auch von Plaque zu Plaque variiert [133], ist eine möglichst genaue Charakterisierung der betroffenen Gefäßwandareale notwendig, um die Komplikationsrate abzuschätzen und die Wahl der am besten geeigneten Behandlungsmethode für den jeweiligen Patienten zu erleichtern.

Im Folgenden werden die im klinischen Alltag bereits etablierten Untersuchungsmethoden zur Diagnostik von atherosklerotischen Formationen vorgestellt. Dabei unterscheidet man zwischen den Methoden, die keinen operativen Eingriff voraussetzen, wie z. B. katheterbasierte bildgebende Techniken, und Methoden, bei denen eine repräsentative Gewebeprobe für weitere *ex vivo* Untersuchungen entnommen werden muss. Heutzutage wird meistens eine Kombination aus beidem verwendet.

Zu den wichtigsten bildgebenden Verfahren zur Untersuchung der Gefäßwandmorphologie gehören intravaskulärer Ultraschall (engl. *Intravascular Ultrasound, IVUS*) und optische Kohärenztomographie (engl. *Optical Coherence Tomography, OCT*). Beide Analysemethoden sind katheterbasiert und ermöglichen eine *in vivo* Arteriendarstellung in Form von 360°-Querschnittsbildern. Der klinische Befund basiert auf der Auswertung der Reflektivität von ausgesendeten Wellen am untersuchten Arterienewebe. Im Fall von IVUS handelt sich dabei um akustische Wellen und im Fall von OCT um elektromagnetische Wellen.

Im Rahmen einer IVUS-Untersuchung wird ein Katheter mit einem äußeren Durchmesser von 0.86-1.17 mm in das zu untersuchende Gefäß eingeführt. Auf der Katheterspitze befindet sich ein rotierender Ultraschallkopf, dessen Rotationsgeschwindigkeit bis zu 1800 Umdrehungen pro Minute betragen kann. Auf dem Schallkopf befinden sich bis zu 200 Piezokristalle, die beim Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung Ultraschallwellen³ aussenden [15], [107].

Bei einer IVUS-Untersuchung dient der Ultraschallkopf sowohl als Sender als auch als Empfänger. Nach dem Aussenden einer Ultraschallwelle wird der Sender abgeschaltet. Die ausgesendete Schallwelle breitet sich im untersuchten Gewebe aus und wird an seinen Inhomogenitäten reflektiert und gestreut. Die reflektierten Schallwellen werden als Echo vom nun als Empfänger agierenden Schallkopf detektiert. Unter Ausnutzen des piezoelektrischen Effekts werden die reflektierten Schallwellen in elektrische Signale umgewandelt, verstärkt und zu Querschnittsaufnahmen des untersuchten Gefäßes zusammengesetzt [15]. Unterschiedliche Gewebearten weisen eine unterschiedliche akustische Dichte auf, die ihrerseits deren Reflexionsverhalten bewirkt. Da das gesunde Gewebe sich durch eine glatte und homogene Struktur auszeichnet, erfolgt die Änderung der Echogenität lediglich an zwei Grenzflächen: Zwischen dem Gefäßlumen und der

³ mit einer Frequenz über 20 kHz.

Intima und zwischen der *Media* und der *Adventitia*. Die Plaqueablagerungen führen zur Entstehung zusätzlicher Grenzflächen. Dies hat eine detektierbare Änderung des Echo-Verhaltens zur Folge.

Die reflektierten Schallwellen lassen sich durch zwei Parameter charakterisieren:

- Zeit zwischen dem Aussenden einer Ultraschallwelle und ihrer darauffolgenden Detektion: In Abhängigkeit von der Entfernung zwischen dem Sender und der reflektierenden Struktur (Grenzfläche) ändert sich dementsprechend auch die Laufzeit.
- Intensität der reflektierten Schallwellen korreliert mit mehreren Faktoren: *Abschwächung* der ausgesendeten Wellen infolge der Absorption beim Durchgang durch das analysierende Gewebe; *Entfernung* zwischen dem Sender und dem Reflektor im betroffenen Gefäßabschnitt (mit zunehmender Distanz nimmt auch die Intensität ab); *Echogenität* des untersuchten Gewebes: Aufgrund der unterschiedlichen Gewebezusammensetzung kommt es zum unterschiedlichen Reflexionsverhalten der Schallwellen an Grenzflächen; *Winkel* zwischen der ausgesendeten akustischen Welle und der reflektierenden Struktur (maximale Reflexion wird bei einer Anordnung von 90° erreicht).

Die durch eine IVUS-Untersuchung erhaltene Information wird überwiegend auf zwei Arten dargestellt. Zum einen kann sie als Reflektivitätsprofil angegeben werden, in dem die Reflektivität des betroffenen Gewebes gegen die zugehörige Eindringtiefe aufgetragen ist (*Amplituden-Scan* oder *A-Scan*) und zum anderen als Darstellung des detektierten Echos in Form intensitätsproportionaler Helligkeit (engl. *Brightness Modulation Scan* oder *B-Scan*). Areale mit Lipidablagerungen und die *Media* sind beispielsweise echoarm und werden in IVUS-Aufnahmen dunkel dargestellt, während die Bereiche höherer Dichte (z. B. Kalzifizierungen und die *Adventitia*) dafür echoreich sind und als helle Gebiete abgebildet werden [107]. Dieses Verhalten ist an exemplarischen IVUS-Bildern der menschlichen Aorta in Abbildung 38 dargestellt.

IVUS eignet sich zur *in vivo* Ausmessung des Lumens und zur Darstellung der Gefäßwände, sowie der angrenzenden Gefäßwandstrukturen. Daraus kann auf die Position, Verteilung und Größe der Plaqueablagerungen geschlossen werden. Aufgrund fehlender Information über die biochemische Zusammensetzung ist jedoch eine Unterscheidung zwischen Strukturen gleicher oder ähnlicher Echogenität nicht möglich, wie es zum Beispiel bei echoarmen weichen Plaques und Thromben der Fall ist. Kalziumablagerungen dagegen sind deutlich echoreicher, d. h. sie reflektieren den Ultraschall sehr stark und erscheinen in B-Scans als sehr helle Bereiche. Dabei kann sogar die sogenannte akustische Verschattung tiefer gelegener Strukturen auftreten. Infolgedessen lassen sich die unter der bestehenden Kalziumschicht eventuell vorhandenen Lipide nicht detektieren. Des Weiteren kann aufgrund der Verschattung auch die Dicke der vorliegenden Kalzifizierungen nicht bestimmt werden. Somit lassen sich die IVUS-Aufnahmen nur bedingt interpretieren.

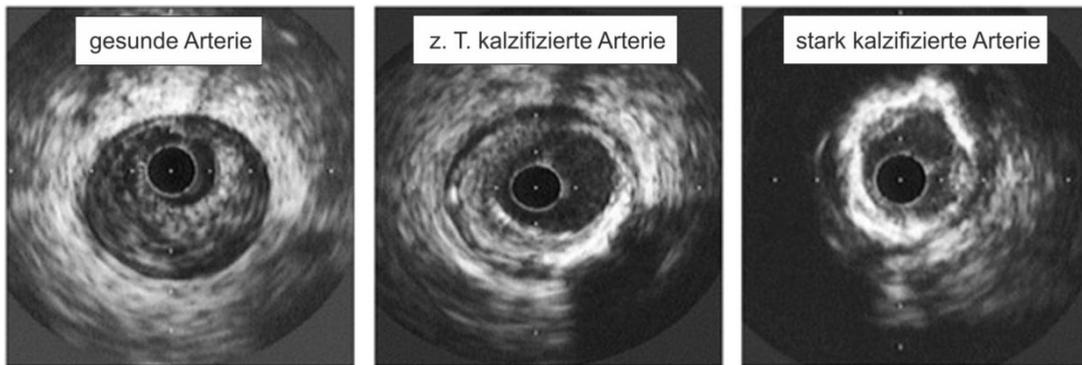


Abb. 38: Exemplarische B-Scans der Koronararterien von 3 verschiedenen Patienten: gesunde Arterie (links), zum Teil kalzifizierte Arterie (Mitte) und eine stark kalzifizierte Arterie (rechts). Aufgrund der starken Reflektivität akustischer Wellen werden die Kalzifizierungen sonographisch durch sehr helle Areale dargestellt (adaptiert aus [17]).

Derzeit lässt sich mit IVUS eine axiale Auflösung von bis zu 100 μm (bei 40 MHz), eine laterale Auflösung von 250 μm (bei 30 MHz) und eine Eindringtiefe von ca. 10 mm (bei 30 MHz) erreichen [134]. Der limitierende Faktor dieser Untersuchungstechnik ist die Frequenz der akustischen Wellen. Bei höheren Frequenzen als 40 MHz beobachtet man eine Verringerung des Kontrastes der IVUS-Aufnahmen infolge zunehmender Streuung an Blut und Blutbestandteilen. Darüber hinaus lassen sich die resultierenden IVUS-Daten aufgrund der Vermischung von Streu- und Laufzeiteffekten teilweise nicht eindeutig interpretieren. Hinweise auf die biochemische Zusammensetzung des untersuchten Gewebes können ebenfalls nicht gewonnen werden.

Eine mit IVUS vergleichbare katheterbasierte Untersuchungsmethode, die auf der Reflexion von elektromagnetischen Wellen am Arterien Gewebe beruht, wird als optische Kohärenztomographie (OCT) bezeichnet.

Bevorzugt werden Anregungswellenlängen im sogenannten „therapeutischen Fenster“ (700-1300 nm) verwendet. Dadurch können starke spektrale Absorptionen des eingestrahnten Lichts durch die zu untersuchenden Gewebe- und Blutbestandteile weitgehend vermieden werden. Ähnlich wie bei IVUS erfolgt die Reflexion von elektromagnetischen Wellen an Grenzflächen von Strukturen mit unterschiedlicher Komposition und dementsprechend mit unterschiedlichen Brechungsindizes. Die anschließende orts aufgelöste Visualisierung von reflektierten Wellen liefert die 2D- oder 3D-Querschnittsabbildungen des untersuchten Gewebes [16], [135].

Im Fall der Schallgeschwindigkeit ist eine direkte Messung der Laufzeit zwischen dem Aussenden einer akustischen Welle und der Detektion der reflektierten Welle technisch realisierbar. Eine vergleichbare Zeitmessung für elektromagnetische Wellen würde Zeitverzögerungen im Femtosekunden-Bereich liefern und somit die Erfassungsmöglichkeit von elektronischen Detektoren übersteigen, deren typischen Reaktionszeiten im Mikrosekunden-Bereich liegen. Infolgedessen erfolgt die Laufzeitmessung durch einen Vergleich des von der Probe reflektierten Signals mit einem

Referenzsignal in einer interferometrischen Anordnung (s. Abb. 39) [16], [135]. Mittels eines halbdurchlässigen Spiegels wird das Licht einer Laserquelle (s. Abb. 39, roter Strahl) in zwei gleiche Teilstrahlen aufgespalten. Der Probenstrahl wird in das zu untersuchende Gewebe und der Referenzstrahl zu einem Spiegel geleitet. In der Koronararterie kommt es zur Reflexion und Vielfachstreuung des Probenstrahls an den im Gewebe vorhandenen Inhomogenitäten. Das gestreute Licht (s. Abb. 39, orange) wird am Strahlteiler mit dem Referenzlicht (s. Abb. 39, blau) kollinear überlagert (s. Abb. 39, grüner Strahl). Aufgrund unterschiedlicher Weglängen der spektralen Komponenten des gestreuten Lichtes treten spektrale Interferenzen im Spektrum des überlagerten Signals auf. Dazu müssen der Proben- und Referenzarm des Interferometers eine leicht unterschiedliche Länge aufweisen, wobei der Unterschied klein genug sein muss, so dass es noch zu signifikanten Interferenzen im Spektrum kommt. Das Interferenzsignal wird von einem Detektor, z. B. einer Photodiode, erfasst. Durch eine Längenänderung von einem der Arme des Interferometers gegenüber dem anderen ergibt sich an der Photodiode eine lineare Autokorrelation. Daraus kann das Zeitsignal des Streulichtes rekonstruiert werden. Es ist ebenfalls möglich, die Länge des Referenzarms konstant zu halten, so dass nur Streulicht mit einer bestimmten Eindringzeit mit dem Referenzlicht konstruktiv zur Interferenz gebracht wird.

Somit lässt sich auch mit der OCT ein Reflektivitätsprofil (A-Scan) aufnehmen, in dem die Reflektivität als Funktion der Eindringtiefe aufgetragen ist. Ähnlich zu IVUS besteht auch die Möglichkeit, das reflektierte Signal in Form von intensitätsproportionaler Helligkeit darzustellen (B-Scan) (s. Abb. 39a, b, c): Ähnlich wie bei IVUS sind die Arterienbereiche hoher Reflektivität besonders hell, während die Areale niedrigerer Reflektivität dunkler sind [135].

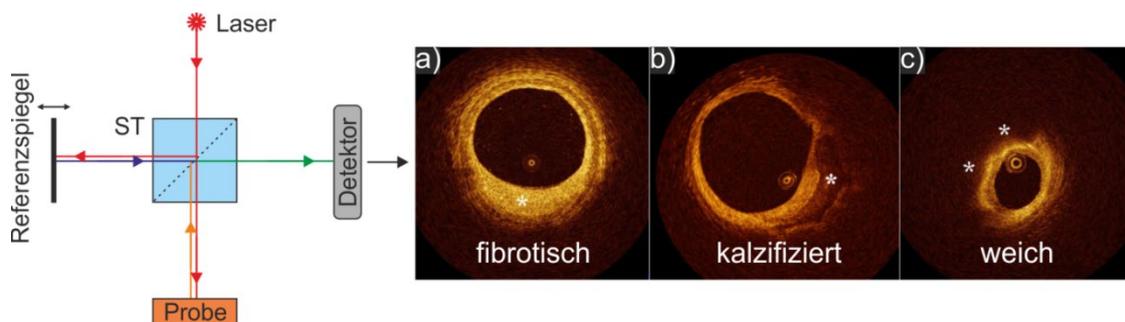


Abb. 39: Funktionsweise der optischen Kohärenztomographie mit exemplarischen B-Scans der Koronararterien von drei Patienten. Das Interferenzsignal (grün) kann als B-Scan dargestellt werden. Die Bereiche, auf die eingegangen wird, sind mit weißen Sternen gekennzeichnet. In a) ist eine fibrotische Plaque gezeigt, die an ihrem homogenen, starken Signal der Kollagenfasern erkennbar ist. In b) wird eine kalzifizierte Plaque dargestellt, die sich durch ein vergleichsweise schwaches Signal und dessen scharfe Abgrenzung zum umliegenden Gewebe charakterisieren lässt. Ein Beispiel für eine weiche Plaque ist in c) gezeigt. Sie liefert zwar ebenfalls ein geringes Signal, wie eine kalzifizierte Läsion, die Abgrenzung zum umliegenden Gewebe ist aber diffus (adaptiert aus [136]).

Die axiale Auflösung ist hierbei durch die Bandbreite der benutzten Infrarotquelle gegeben und beträgt ca. 2-30 μm . In Abhängigkeit von der Strahltaile liegt die laterale Auflösung bei 5 bis 30 μm . Im Falle von transparenten Medien kann die Eindringtiefe von OCT bis zu 2 cm betragen (z. B. bei der Bestimmung der Retinadicke). In Blutgefäßen lässt sich eine Eindringtiefe aufgrund der benutzten Wellenlänge im NIR-Bereich von höchstens ca. 1-2 mm erreichen, wobei die Absorption des Lichtes durch das Blut ein limitierender Faktor bei OCT ist [16]. Die mit OCT erreichbare Auflösung ermöglicht zwar eine sichere Identifikation von pathologischen Verdickungen der *Intima* und Plaquerupturen, fibröse, kalzifizierte und komplette Plaqueformationen können jedoch aufgrund der geringen Eindringtiefe nicht ausgemessen werden. Dementsprechend lässt sich das in den Gefäßwänden enthaltene Lipidvolumen nicht bestimmen und dadurch die mögliche Komplikationsrate nicht abschätzen.

Im Vergleich zu IVUS besitzt OCT eine deutliche geringere Eindringtiefe, liefert aber signifikant höher aufgelöste Aufnahmen von Koronararterien (s. Tab. 6). Dies macht die Erkennung zusätzlicher morphologischer Strukturen möglich.

Kriterium	IVUS	OCT
Laterale Auflösung	100 μm	15-20 μm
Axiale Auflösung	250 μm	20-40 μm
Eindringtiefe	10 mm	1-2 mm

Tab. 6: Gegenüberstellung der Auflösung und der Eindringtiefe von IVUS und OCT [16], [137].

Bei hinreichend hoher räumlicher Auflösung liefern bildgebende *in vivo* Untersuchungsverfahren, wie IVUS oder OCT, wichtige Informationen über die Position, Größe und Stadium atherosklerotischer Plaques. Da jedoch keins dieser Verfahren Rückschlüsse auf die biochemische Zusammensetzung des pathologisch veränderten Gewebes und damit auf das mögliche Gesundheitsrisiko zulässt, kann es zu Fehldiagnosen aufgrund nicht detektierter Gefäßveränderungen kommen. Infolgedessen ist eine weitere Charakterisierung der Blutgefäße erforderlich, die aber mit der im Rahmen einer Biopsie erfolgten Entnahme einer oder mehrerer repräsentativen Gewebeproben verbunden ist.

Üblicherweise folgt auf die Biopsie eine histologische Begutachtung, um weitere Informationen über den strukturellen Aufbau der vorhandenen Plaqueablagerungen in Erfahrung zu bringen.

Ungefärbtes Gewebe ist normalerweise sehr kontrastarm und einzelne Strukturen lassen sich nur schwer erkennen. Um den Kontrast zu erhöhen, werden die zu untersuchenden

Schnitte angefärbt. Als Standard der histochemischen Färbung gilt die H&E-Übersichtsfärbung (**H**ämatoxylin und **E**osin). Hämatoxylin ist basisch und färbt basophile Substanzen in der Zelle oder im Gewebe an, z. B. Nukleinsäuren, die danach blau bis schwarz erscheinen. Der Eosin-Farbstoff hat einen sauren Charakter und färbt dementsprechend Zytoplasma und Kollagen rosa bis rot an [138]. Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, kann man Spezialfärbungen einsetzen, die eine Affinität zu anderen Gewebestrukturen zeigen. Für den Nachweis von Lipiden bieten sich zum Beispiel die klassischen Farbstoffe wie Oil-Red-O und Sudanschwarz an [139]. Die histologischen Untersuchungen erlauben zwar Rückschlüsse auf das vorliegende Läsionsstadium, liefern aber keine Informationen über die molekulare Zusammensetzung der zu analysierenden Plaques.

Ein weiteres Biopsie-Verfahren zur Charakterisierung von Gewebeschnitten ist die Massenspektrometrie. Dabei wird der Analyt ionisiert und daraufhin eine Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z durchgeführt. Daraus kann auf die Elementarzusammensetzung der zu untersuchenden Substanz geschlossen werden.

Die Ionentrennung setzt eine vorherige Ionisation der zu untersuchenden Substanz voraus. Heutzutage gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Ionenerzeugung, z. B. die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. *Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization, MALDI*). Die Ionenerzeugung wird durch Laserbeschuss erreicht. Zuvor wird eine spezielle Polymermatrix z. B. durch Aufsprühen auf die zu untersuchende Probe aufgebracht. Die Funktion der Matrix besteht dabei in der Trennung von einzelnen Biomolekülen und Vermeidung von pyrolytischen Effekten durch Absorption der hochenergetischen Laserstrahlung. Typischerweise besteht eine Matrix aus kleinen organischen Molekülen, die die verwendete Laserwellenlänge stark absorbieren und in einem wässrig-organischen Lösungsmittel gelöst sind. Nach seinem Verdunsten bildet die Matrix ein Kristallgitter, in dem die Analytmoleküle eingebettet sind.

Nach der Inkorporation in die Matrix und der darauffolgenden gepulsten Laserbestrahlung kommt es zur Freisetzung und Überführung von ionisierten Analytfragmenten in die Gasphase (Desorption). Dabei werden überwiegend Laser mit Emissionswellenlängen im UV-Spektralbereich verwendet.

Auf die Ionenerzeugung folgt die Ionentrennung in einem elektrischen oder magnetischen Feld entsprechend dem m/z -Verhältnis der Ionen [140]. Eine der Möglichkeiten, dies zu realisieren, besteht in der Kombination der MALDI-Massenspektrometrie mit einem Flugzeitanalysator, in dem die entstandenen Ionen in einem evakuierten Flugrohr in Anwesenheit eines elektrischen Feldes anhand ihrer Flugzeiten (engl. *Time-of-Flight, TOF*) separiert werden: Leichte Ionen sind schneller und kommen dementsprechend schneller am nachgeschalteten Detektor, z. B. Sekundärteilchenvervielfacher, an. Deren Flugzeit ist proportional zur Wurzel des m/z -Verhältnisses. Das resultierende Signal wird in Form eines Massenspektrums dargestellt, in dem die relative Ionenhäufigkeit (Anzahl

der auftreffenden Ionen) gegen das ganzzahlige zugehörige m/z -Verhältnis aufgetragen ist. Zur Interpretation der aufgenommenen Spektren werden u. a. massenspektrometrische Datenbanken herangezogen. Caprioli et. al haben bereits 1997 gezeigt, dass es möglich ist, die MALDI-TOF-Massenspektrometrie auch als bildgebendes Verfahren anzuwenden, in dem ähnlich wie bei CARS die Verteilung von verschiedenen Substanzen innerhalb der zu untersuchenden Probe erfasst wird [111].

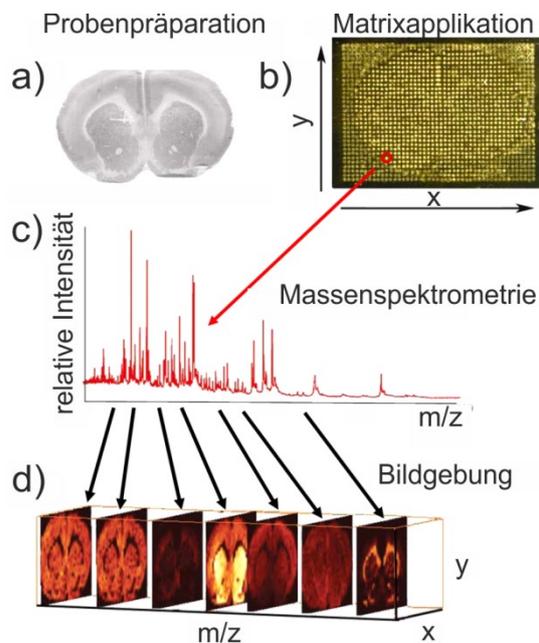


Abb. 40: Funktionsweise der bildgebenden MALDI-TOF-Massenspektrometrie. a) Im ersten Schritt wird ein histologischer Querschnitt des zu untersuchenden Gewebes erstellt. b) Einbettung der Probe in eine Polymermatrix. c) Nach der Ionentrennung im Flugzeitanalysator wird das m/z -Verhältnis in einem Massenspektrum gegen die relative Häufigkeit aufgetragen. Ein solches Spektrum wird an jedem Ortspunkt (Pixel) der Matrix aufgenommen. In d) wird die resultierende Rekonstruktion der Daten in 2D-Plots gezeigt, die die räumliche Verteilung einer spezifischen Substanz, z. B. Proteine, darstellt (adaptiert aus [110]).

Dafür wird die Probe, z. B. ein Gewebeschnitt, in den vordefinierten Abständen Punkt für Punkt vom Verdampfungslaser abgerastert (s. Abb. 40). An jedem Messpunkt wird ein Massenspektrum aufgenommen und ortskorreliert abgespeichert. Einzelne Gewebekomponenten werden anhand ihrer Massensignale lokalisiert und deren Verteilung in der zu analysierenden Probe mit Hilfe einer farbkodierten Intensität dargestellt. Die erreichbare Ortsauflösung liegt dabei bei etwa $10\ \mu\text{m}$ [110].

Im Vergleich zur histologischen Untersuchung setzt die MALDI-TOF-Methode sowohl keine Marker als auch keine Vorkenntnis der vorliegenden Gewebekomponenten voraus. Infolgedessen können auch unbekannte Zielmoleküle detektiert werden [141]. Mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie lassen sich sowohl die biochemische Zusammensetzung der zu untersuchenden Substanz als auch die Verteilung ihrer einzelnen Bestandteile innerhalb der Probe bestimmen [142], [143]. Die mittels dieser Methode erreichbare chemische Sensitivität ermöglicht also auch die Unterscheidung zwischen gesundem und neoplastischem Gewebe und die Charakterisierung von den vorhandenen Plaqueformationen [142]. Die massenspektrometrischen Untersuchungen gehören zwar zu materialverbrauchenden analytischen *in vitro* Verfahren, bedürfen aber geringer Menge der zu untersuchenden Substanz. Es können jedoch anstelle der

Ionisierungsprozesse thermische Reaktionen durch laserinduzierte lokale Temperaturerhöhungen initiiert werden. Somit kann das resultierende Massenspektrum nicht die Elementarzusammensetzung des Analyten, sondern die seiner thermisch bedingten Zerfallsprodukte zeigen [109].

Zu den molekülspezifischen Charakterisierungsmethoden gehört ebenfalls die spontane Raman-Spektroskopie. Im Vergleich zum massenspektrometrischen Verfahren führt sie aber aufgrund ihrer minimal-invasiven Natur nicht zum Substanzverlust und bedarf keiner aufwendigen Präparation. Pathologische Veränderungen des zu analysierenden Gewebes führen zu Variationen in den zugehörigen Raman-Spektren, von denen Rückschlüsse auf die vorhandenen funktionellen Gruppen gezogen werden können. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, ebenfalls die Verteilung einzelner detektierter Komponenten innerhalb der zu untersuchenden Probe mittels CARS zu bestimmen. Im Folgenden die Anwendbarkeit der spontanen Raman-Spektroskopie für die Gefäßdiagnostik anhand von humanen Koronarquerschnitten evaluiert.

4.1.4 Probenpräparation

Das in dieser Arbeit verwendete klinische Material ist humanes Gewebe von Koronararterien, das am Herz- und Diabeteszentrum in Bad Oeynhausen im Rahmen von Herztransplantationen operativ entnommen wurde. Das in Form von kleinen Blöcken entfernte Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und bis zu weiteren Gewebeaufbereitungsschritten bei -80°C gelagert. Die üblichen Schichtdicken für die Lichtmikroskopie liegen bei 5-8 µm und für die Elektronenmikroskopie bei 50 nm [144]. Bei Bedarf können aber auch dünnere oder dickere Schnitte präpariert werden.

Da die hier gezeigten Messungen mit der spontanen Raman-Spektroskopie durchgeführt wurden, musste bei der Schnittherstellung ein Kompromiss in Bezug auf die Schichtdicke der einzelnen Querschnitte getroffen werden. Das Gewebe lässt sich in sehr dünne Schnitte (unter 2-3 µm) nur unter Zugabe einer stabilitätsfördernden Matrix (z. B. Paraffin) schneiden, die das Auftreten zusätzlicher Resonanzen im Fingerabdruck-Bereich des Raman-Spektrums verursacht [145]. Da sie für die Charakterisierung des Gewebes nicht von Bedeutung und eher störend sind, müssen die im Paraffin eingebetteten Proben im Anschluss an die Schnittanfertigung gründlich entparaffiniert werden. Dies ist mit einem zusätzlichen Präparationsaufwand und eventuellen Verunreinigungen oder Veränderungen des Probenmaterials verbunden.

Trotz des vergleichsweise großen Probenvolumens liefern die dickeren Querschnitte nicht zwangsläufig ein stärkeres Raman-Signal. Mit steigender Schichtdicke nimmt auch störende Autofluoreszenz durch endogene Fluorophore der einzelnen Gewebebestandteile

(z. B. Kollagen, Elastin) zu. Im schlimmsten Fall kann dies zur kompletten Überdeckung des schwachen Raman-Signals führen (vgl. Kap. 2.2.3). Infolgedessen wurden die seriellen Schnitte des Koronararteriengewebes mit einer Schichtdicke von ca. 13 μm (laut z-CARS-Scans) unter Zuhilfenahme eines Gefriermikrotoms (Leica CM3050S) bei -23°C angefertigt und direkt beim Schneiden auf MgF_2 -Substraten platziert (s. Kap. 3.3). Um die Unversehrtheit und Formerhaltung der Proben während des Schneidevorgangs im Kryostat zu gewährleisten, muss das entnommene Gewebe vor dem Schneiden in ein sogenanntes Optical-Cutting-Temperature-Medium eingebettet werden. Dieses Einbettmaterial besteht aus einer Mischung von Polyethylenglykol und Polyvinylalkohol zur Konservierung des Gewebes kombiniert mit Antimykotika und Antibiotika [146]. Bei niedrigen Temperaturen bildet das Optical-Cutting-Temperature-Medium eine feste Matrix, die unter anderem für die Stabilisierung des Gewebes sorgt und keine zusätzlichen Peaks im Raman-Spektrum erzeugt [147], [148].

4.1.5 Probencharakterisierung mit Lichtmikroskopie und histologischer Färbung

Aus Anonymitätsgründen wurden die entnommenen Querschnitte mit alpha-numerischen Codes versehen. Die allgemeinen Informationen, wie das Geschlecht und Alter, zu den einzelnen Spendern liegen aber vor (s. Tab. 7).

Spender	Geschlecht	Alter
BO-P1	männlich	64
BO-P2	männlich	68
BO-P3	männlich	62

Tab. 7: Auflistung der Spender, wobei die Namen durch alpha-numerische Codes ersetzt wurden.

Zu Beginn wurden die entnommenen Querschnitte mittels eines konventionellen Lichtmikroskops auf ihre Intaktheit kontrolliert. Bei der Schnittherstellung kam es aus unterschiedlichen Gründen zum Zerreißen oder sonstigen Defekten des Gewebes. Für die weitere Charakterisierung wurden nur unversehrte Querschnitte ausgewählt. Diese sind in Abbildung 41 für den jeweiligen Spender gezeigt: BO-P1 (s. Abb. 41a), BO-P2 (s. Abb. 41b) und BO-P3 (s. Abb. 41c).

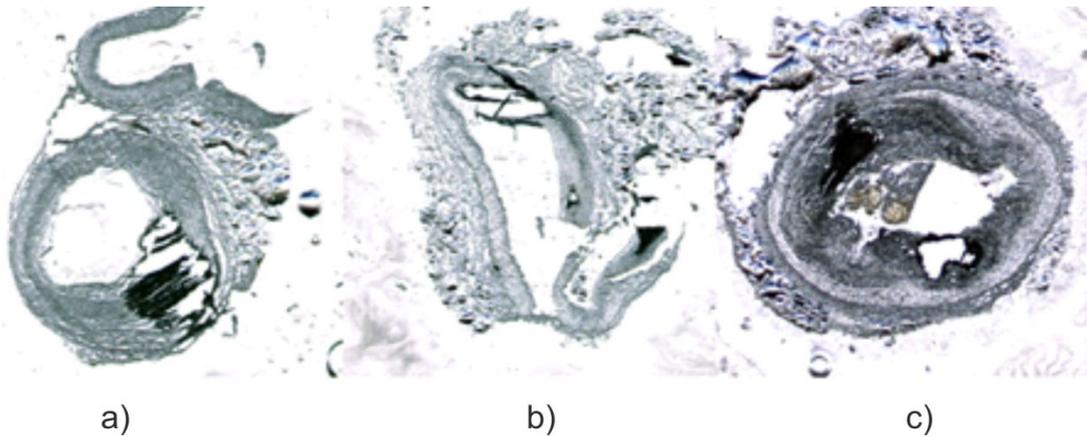


Abb. 41: Transmissionsmikroskopie-Aufnahmen der zu analysierenden Koronarquerschnitte. Entsprechend der Patientenbezeichnung aus Tabelle 7: a) BO-P1, b) BO-P2 und c) BO-P3 (adaptiert aus [149])

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle drei in Abbildung 41 gezeigten Querschnitte durch Raman-Messungen charakterisiert, es werden aber nur die Untersuchungsergebnisse von Spender BO-P3 vorgestellt (s. Abb. 41c). Diese Probe weist einen schweren atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitt auf und enthält sowohl Plaques als auch ausgeprägte Kalzifizierungsbereiche im fortgeschrittenen Stadium. Damit ist sie am interessantesten für die weiteren Untersuchungen.

Während die Kalzifizierungsareale in den zu analysierenden Proben sich an ihrer schwarzen Färbung auch mittels der konventionellen Lichtmikroskopie ohne zusätzliche Probenbehandlung erkennen lassen, heben sich vorhandene Plaqueablagerungen von ihrer Umgebung nicht eindeutig ab. Um genauere Aussagen zu treffen, wird der Kontrast mit Hilfe einer histologischen Färbung erhöht. Dadurch werden morphologische Unterschiede deutlicher sichtbar. Da die Farbstoffe einen störenden Untergrund in den Raman-Spektren (bei Laseranregung mit 785 nm) hervorrufen, wurden nicht die in Abbildung 41 gezeigten Querschnitte, sondern deren Folgeschnitte mit H&E angefärbt (vgl. Kap. 4.1.3) und an einen Pathologen, PD Dr. Udo Kellner, vom Institut für Pathologie, Zytologie und Molekularpathologie in Minden zur Auswertung geschickt.



Abb. 42: Kontrasterhöhung durch H&E-Färbung eines Folgeschnitts des in Abbildung 41 gezeigten Querschnitts von Spender BO-P3. In blau werden saure Gewebebestandteile (z. B. Zellkerne) und in rosa basische Gewebestrukturen (z. B. Zytoplasma oder Kollagen) dargestellt. Die eingezeichneten orangen Sternchen markieren die vom Pathologen identifizierten Kalzifizierungsstellen, wobei eine davon herausgebrochen ist (adaptiert aus [149]).

Laut Befund des Pathologen handelt es sich beim untersuchten Querschnitt von Spender BO-P3 um eine stenosierende Atherosklerose mit zwei gegenüberliegenden deutlich ausgeprägten Plaques, wobei jede davon eine Kalzifizierung aufweist (s. Abb. 42, orange Sternchen). Die Tatsache, dass neben der *Intima* auch die *Media* von pathologischen Veränderungen betroffen ist, deutet auf atherosklerotische Läsionen im fortgeschrittenen Stadium hin. Nekrotisches Gewebe und weiche Plaqueformationen lassen sich allerdings nicht erkennen. Der vollständige Evaluationsbericht des Pathologen kann im Anhang der Masterarbeit von Jens Vogt nachgeschlagen werden [149]. Weitere detaillierte Informationen zu den einzelnen Gewebeschnitten können ebenfalls der oben genannten Masterarbeit entnommen werden.

Unter Berücksichtigung dieses Berichts wurden die für die darauffolgenden Raman-Messungen interessanten Bereiche des in Abbildung 42 gezeigten Querschnitts von Spender BO-P3 markiert (s. Abb. 43). Diese Areale weisen die klassischen morphologischen Kriterien der fortgeschrittenen Atherosklerose auf: Zwei Kalzifizierungsstellen, wobei eine davon herausgebrochen ist (s. Abb. 43, orange Sternchen), und zwei Plaqueformationen (s. Abb. 43, grüner und gelber Pfeil). An diesen Probenpositionen wurden dann Raman-Messungen durchgeführt, die in Kapitel 4.1.6 vorgestellt werden.

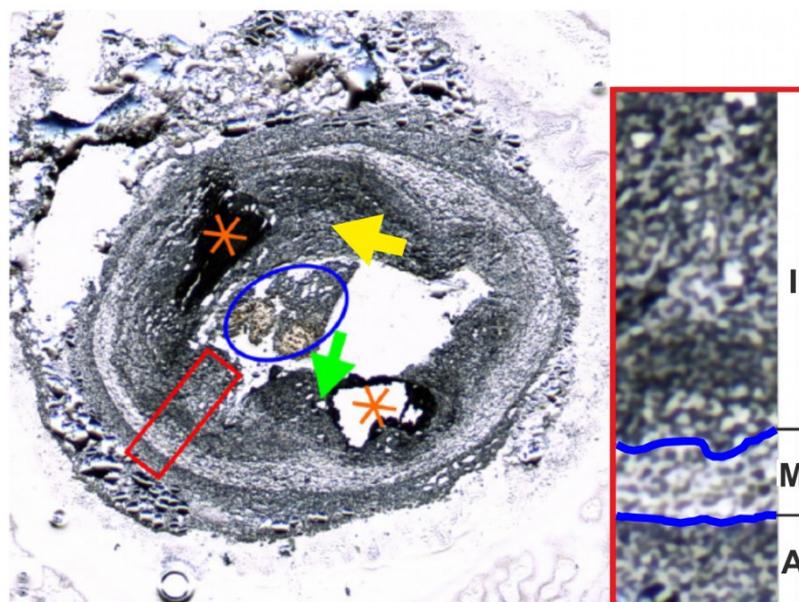


Abb. 43: Durchlichtbild des in Abbildung 42 gezeigten Querschnitts von Spender BO-P3 (links) und im roten Rechteck (rechts) eine dazugehörige Ausschnittvergrößerung der drei Schichten der Arterienwand: *Tunica intima* (I), *Tunica media* (M) und *Tunica adventitia* (A). In dem Übersichtsbild (links) sind die beiden Plaques mit einem grünen und einem gelben Pfeil und die beiden Kalzifizierungsbereiche mit orangefarbenen Sternchen markiert, wobei eine der beiden Kalzifizierungen herausgebrochen ist. Ein blauer Kreis umrandet ein Artefakt im Lumen, das höchstwahrscheinlich aus Geweberesten und Blut besteht und während des operativen Eingriffs entstanden ist. Das rot umrandete Rechteck (rechts) stellt eine Vergrößerung des rot umrandeten Bereiches aus dem Übersichtsbild dar (adaptiert aus[149]).

4.1.6 Gewebecharakterisierung mittels Raman-Spektroskopie

In diesem Kapitel wird eine atherosklerotische kalzifizierte Plaueformationen mittels der spontanen Raman-Spektroskopie charakterisiert. Die Messungen erfolgen am im vorigen Kapitel 4.1.5 vorgestellten Querschnitt von Spender BO-P3.

Anhand der vorausgegangenen histologischen Beurteilung des zu untersuchenden Schnittes können die kalziumreichen Bereiche im Lichtmikroskop eindeutig lokalisiert werden. Aber auch ohne die H&E-Färbung lassen sie sich an ihrer dunkleren Farbe erkennen (s. Abb. 44a), die sich vom eher kontrastarmen umliegenden Gewebe abhebt.

Nach der Lokalisierung einer Kalzifizierungsstelle (Probenposition 1) wurden an dieser Stelle punktuelle Raman-Spektren aufgenommen (s. Abb. 44b, rot gestrichelter Kreis). Ein exemplarisches Beispiel dafür ist in Abbildung 44c gezeigt.

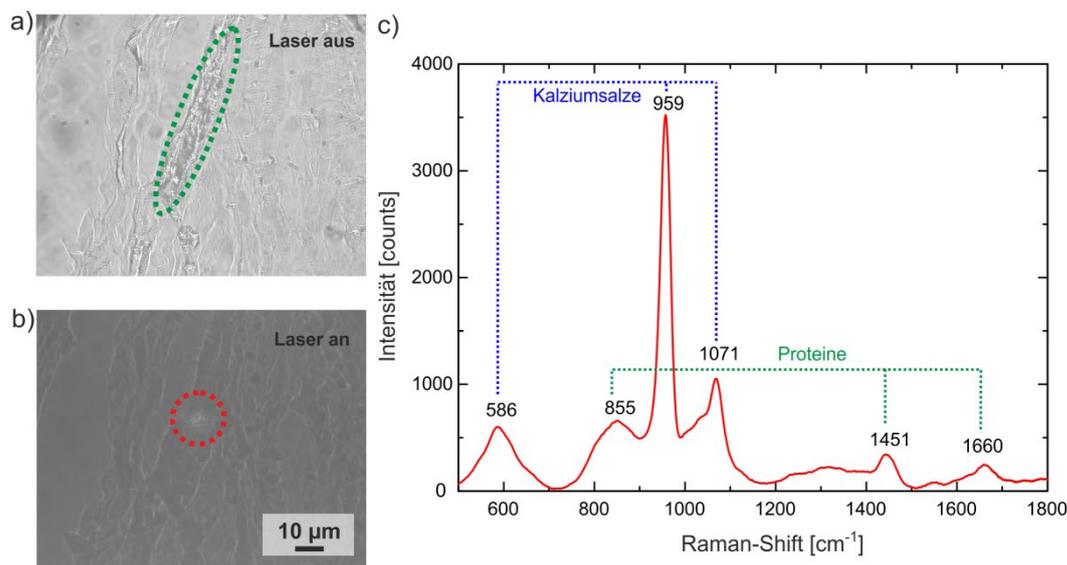


Abb. 44: Kalzifizierungsidentifizierung an der Probenposition 1 in der *Intima* von Spender BO-P3. a) Transmissionsmikroskopiebild der Probenposition 1 des untersuchten Querschnitts mit einem kalziumreichen Bereich (grün umrandet). Dabei handelt sich um eine Stelle der mit orangem Sternchen markierten Kalzifizierung aus Abbildung 43. b) Gleiche Probenstelle wie in a) mit dem Laserfokus (roter Kreis) zur Raman-Anregung. Dieser erscheint aufgrund von Streuung des Laserlichtes am Gewebe größer. An dieser Stelle wurde das in c) gezeigte Raman-Spektrum aufgenommen, wobei die Kalzium-spezifischen Raman-Banden (586 cm^{-1} , 959 cm^{-1} und 1071 cm^{-1}) in blau und die Protein-spezifischen Banden (855 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} und 1660 cm^{-1}) in grün gekennzeichnet sind. Das Hintergrundsignal wurde mit Hilfe des Lieber-Algorithmus abgezogen. Das Spektrum wurde mit einer Wellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW und einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) durchgeführt. Die Integrationszeit beträgt 10 s und das hier dargestellte Spektrum wurde durch eine Akkumulation über 10 Spektren gewonnen, die an der gleichen Stelle aufgenommen wurden (adaptiert aus [150]).

Im in Abbildung 44 gezeigten Raman-Spektrum wurden die für die Auswertung wichtigen Resonanzen eingezeichnet. Die drei Peaks bei 586 cm^{-1} , 959 cm^{-1} und 1071 cm^{-1} sind den Kalziumsalzen (Kalziumhydroxylapatit und Kalziumcarbonat)

zuzuordnen [151], [39]. Die Raman-Bande bei 586 cm^{-1} wird durch die out-of-plane PO_4 -Biegeschwingungen der Phosphatgruppe hervorgerufen. Der Peak bei 959 cm^{-1} stammt von den symmetrischen PO_4 -Vibrationen der vorhandenen Phosphate, während sich der Peak bei 1071 cm^{-1} den symmetrischen CO_3 -Schwingungen von Carbonaten und den antisymmetrischen PO_4 -Vibrationen zuordnet lässt.

Neben den bereits genannten Kalzium-typischen Raman-Resonanzen liegen auch weitere Peaks vor: 855 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} . Diese deuten auf die Präsenz von Proteinen, also weichen Gewebekomponenten, an der untersuchten Probenposition hin. Die C-C-Streckschwingung von Prolin liegt bei 855 cm^{-1} , die C-H-Deformationsschwingung bei 1451 cm^{-1} und die C=O-Streckschwingung der Peptidcarbonylgruppe (Amid I-Schwingung) bei 1660 cm^{-1} [39], [152], [153]. Diese Vibrationsschwingungen sind typisch für Strukturproteine, wie z. B. Kollagen oder Elastin. Die beiden Substanzen kommen in atherosklerotischen Läsionen vorwiegend in der fibrösen Kappe vor (vgl. Kap. 4.1.2). Das legt die Vermutung nahe, dass hier eine fibrotische Plaquetformation mit Kalziumablagerungen vorliegt. Dementsprechend handelt sich bei der untersuchten Probenposition 1 nicht um eine reine „Verkalkung“.

Laut Befund des Pathologen konnten im mit H&E angefärbten Gewebequerschnitt zwei kalziumreiche Areale identifiziert werden, wobei eins davon herausgebrochen ist. Basierend auf den dominanten Kalzium-spezifischen Resonanzen bestätigen die aufgenommenen Raman-Spektren dieses Untersuchungsergebnis. Kollagen und Elastin, welche durch die Raman-Messungen nachgewiesen wurden, konnten vom Pathologen allerdings nicht identifiziert werden. Da es sich bei pathologischen Untersuchungen um reine Beurteilung der Probenoberfläche handelt, können die unter der Kalzifizierung befindlichen Gewebekomponenten nicht erkannt werden. Aufgrund der Verschattung würde man mit IVUS und OCT ebenfalls die darunterliegenden Gewebeschichten nicht identifizieren können (vgl. Kap. 4.1.3).

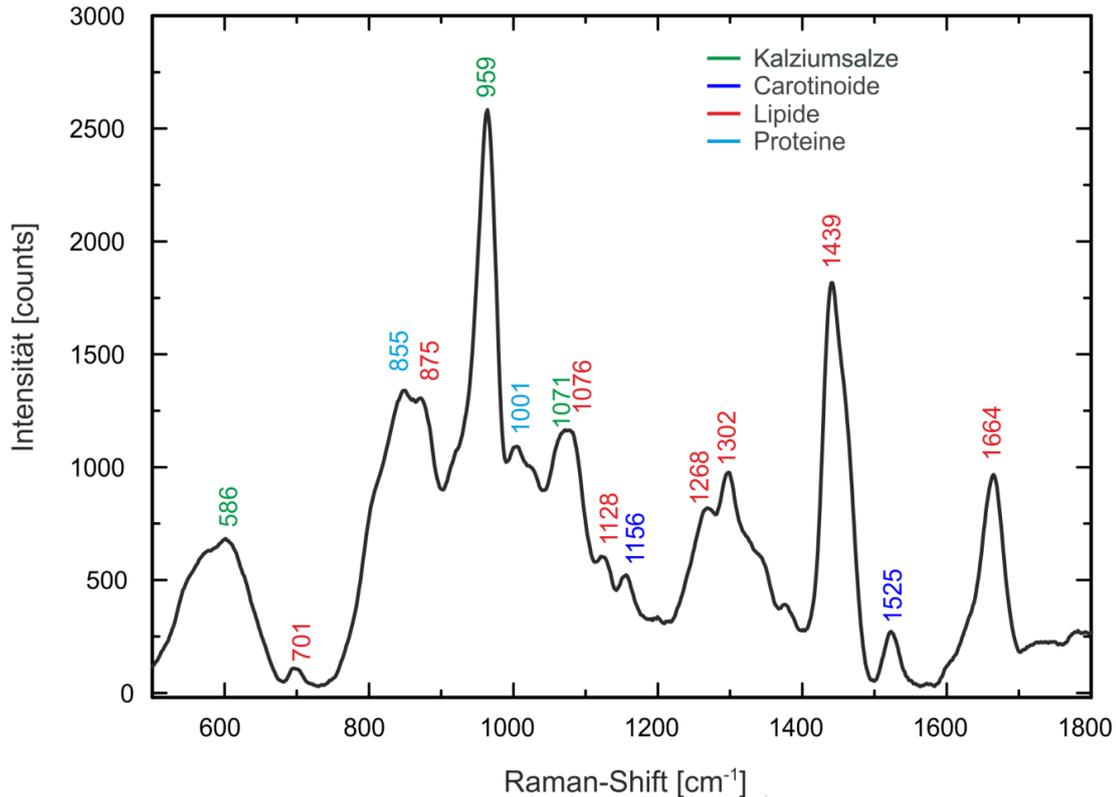


Abb. 45: Exemplarisches Raman-Spektrum von Probenposition 2. Die einzelnen Raman-Peaks sind nach Zugehörigkeit farblich gekennzeichnet: Kalziumsalze in grün, Carotinoide in blau, Lipide in rot und Proteine in türkis. Das Hintergrundsignal wurde mit Hilfe des Lieber-Algorithmus abgezogen. Das Spektrum wurde mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW und einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) aufgenommen. Die Integrationszeit beträgt 10 s und das hier dargestellte Spektrum stellt eine Akkumulation über 10 Spektren dar, die an der gleichen Stelle aufgenommen wurden (adaptiert aus [150]).

In der in Abbildung 44 gezeigten Raman-Messung konnten neben Kalziumsalzen auch Proteine detektiert werden. Diese zusätzliche Information über die genaue Zusammensetzung des Gewebes an der untersuchten Probenposition spielt eine wichtige Rolle bei der Abschätzung der möglichen Komplikationsrate: Die nachgewiesenen Kalziumablagerungen sind Bestandteile einer atherosklerotischen Läsion [154]. Fibrokalzifizierte Plaqueformationen sind vulnerable Formationen und erhöhen dementsprechend maßgeblich das Risiko einer Ruptur mit einem darauffolgenden kardiovaskulären Ereignis: Im Rahmen einer Studie konnte von Farb et. al bei ca. 70% der erfolgten Plaqueeinrisse der Koronarkalk nachgewiesen werden [155].

Als Nächstes wird eine in der pathologischen Untersuchung als atherosklerotische Plaqueablagerung identifizierte Probenposition mittels der Raman-Spektroskopie untersucht. Diese Stelle befindet sich in der *Intima* links von der zum größten Teil herausgebrochenen Kalzifizierung und ist in Abbildung 43 mit einem grünen Pfeil markiert. Im Folgenden wird sie als Probenposition 2 bezeichnet. Ein exemplarisches Spektrum davon wird in der Abbildung 45 gezeigt.

Die Peakzuordnung wurde zur Übersicht in der unten stehenden Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 8).

Raman-Mode [cm^{-1}]	Zuordnung	Quelle
586	out-of-plane PO_4 -Biegeschwingung: Kalzifizierungen	[151]
701	Sterol-Bande: Cholesterin	[152]
855	C-H-Deformation von Prolin: Kollagen	[39]
875	Sterol-Bande: Freies Cholesterin und Cholesterinester	[39]
959	Symmetrische Schwingung von Phosphaten: Kalzifizierungen	[39]
1001	Phenylalanin: Proteinogene Aminosäure	[39]
1071	Symmetrische Schwingung von Carbonaten: Kalzifizierungen	[39]
1076	C-C-Streckschwingung: Fettsäuren	[156]
1128	C-H-Deformation: Fettsäuren	[157]
1156	C-C-Streckschwingung: Carotinoide	[39]
1268	C-H-Biegeschwingung: Fettsäuren	[152]
1302	CH_2 -Drehschwingung: Fettsäuren	[156]
1439	CH_2 -Scherschwingung: Cholesterin und Cholesterinester	[156]
1525	In-Phase C=C-Streckschwingung: Carotinoide	[39]
1664	C=C-Streckschwingung: Cholesterin und Cholesterinester	[128]

Tab. 8: Zusammenfassung der Peaks im Raman-Spektrum (s. Abb. 45) mit den dazugehörigen Quellen.

Im aufgenommenen Raman-Spektrum treten in erster Linie Schwingungsmoden auf, die sich Lipiden (Cholesterin und seinen Estern) zuordnen lassen: 701 cm^{-1} , 875 cm^{-1} ,

1076 cm^{-1} , 1128 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} , 1302 cm^{-1} , 1439 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} (s. Abb. 45, rote Beschriftung). Dies legt die Vermutung nahe, dass an der untersuchten Probenposition 2 eine lipidreiche Plaque vorliegt. Darüber hinaus lässt sich von den vorhandenen Lipid-Peaks auf deren Zusammensetzung schließen. Die Resonanzen bei 1268 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} deuten auf ungesättigte Fettsäuren hin, während die Peaks bei 1302 cm^{-1} und 1439 cm^{-1} sich gesättigten Fettsäuren zuordnen lassen. Diese sind primär für die Erhöhung des Cholesterinspiegels und damit für das einhergehende erhöhte Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses verantwortlich [158]. In Abbildung 45 ist deutlich zu sehen, dass die Anzahl von gesättigten gesundheitsgefährdenden Fettsäuren signifikant größer ist als die Anzahl von ungesättigten Fettsäuren. Zum Beispiel beträgt das Verhältnis der Intensitäten der repräsentativen Lipid-Resonanzen bei 1439 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} : $I_{1439}/I_{1664} = 2.1$.

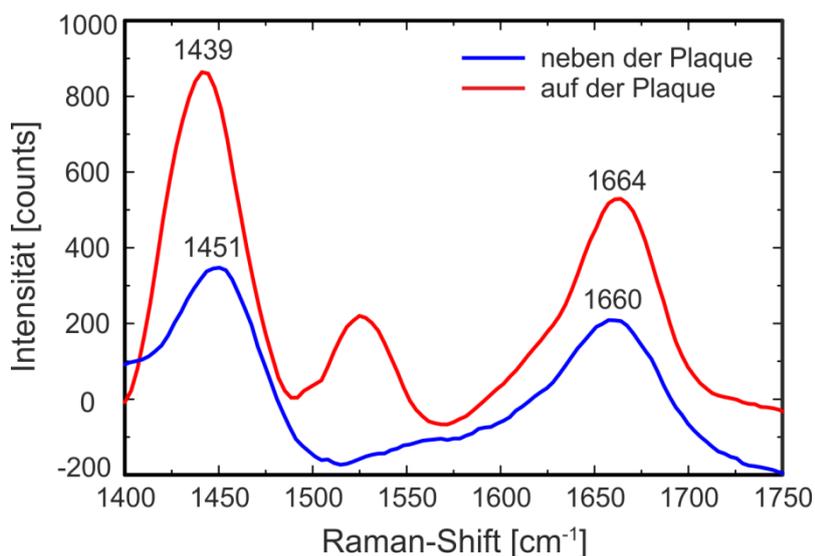


Abb. 46: Exemplarische Raman-Spektren, die von der Probenposition 2 (rot) und einem Areal außerhalb der Plaque (blau) des Querschnitts von Spender BO-P3 aufgenommen wurden. Übersichtshalber wurden die beiden Spektren auf den Bereich zwischen 1400 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} reduziert, um die Verschiebung der Raman-Resonanzen von 1451 cm^{-1} zu 1439 cm^{-1} und von 1660 cm^{-1} zu 1664 cm^{-1} infolge der Lipidanreicherung hervorzuheben. Das Hintergrundsignal wurde mit Hilfe des Lieber-Algorithmus abgezogen. Die beiden Spektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW und einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) aufgenommen. Die Integrationszeit beträgt 10 s und jedes der hier dargestellten Spektren stellt eine Akkumulation über 10 einzelne Spektren dar, die an der gleichen Stelle aufgenommen wurden.

Die oben genannten Lipid-Resonanzen bei 1439 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} dienen deshalb als Cholesterin-Marker [128]. Zum Vergleich wurde ein Raman-Spektrum außerhalb der Plaque aufgenommen (s. Abb. 46). Das nicht-atherosklerotische Gewebe wird durch die Präsenz der Protein-Peaks bei 1451 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} charakterisiert (s. Abb. 46, blaue Kurve), die aber auch in Kombination mit den Kalzium-Resonanzen in der fibrösen Plaquekappe vorkommen können. In atherosklerotischen Läsionen (s. Abb. 46, rote

Kurve) dagegen beobachtet man eine Verschiebung der beiden Protein-Resonanzen zu 1439 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} . Diese leichte Resonanzverschiebung lässt sich auf die Anreicherung von Lipiden in Form von Cholesterin und Cholesterinester im erkrankten Gewebe zurückführen.

Neben den Lipiden können an der Probenposition 2 des zu analysierenden Querschnitts auch Kalziumsalze anhand der Schwingungen der Phosphat- und Carbonat-Gruppen bei 587 cm^{-1} , 959 cm^{-1} und 1071 cm^{-1} detektiert werden (s. Abb. 45, grüne Beschriftung). Ebenfalls lassen sich die Protein-Resonanzen bei 855 cm^{-1} und 1001 cm^{-1} detektieren (s. Abb. 45, türkise Beschriftung). Der Raman-Peak bei 1001 cm^{-1} stammt von Phenylalanin-Vibrationen und kommt sowohl im gesunden als auch im neoplastischen Gewebe vor. Die Resonanz bei 855 cm^{-1} ist eher typisch für Kollagen, das die fibröse Plaquekappe bildet.

Darüber hinaus belegen die aufgenommenen Spektren die Anwesenheit von Carotinoiden anhand der Peaks bei 1156 cm^{-1} und 1525 cm^{-1} an der untersuchten Probenposition 2 (s. Abb. 45, blaue Beschriftung). Als Carotinoide bezeichnet man lipophile gelbliche Pigmente pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die mit der Nahrung aufgenommen werden können und sich durch ihre antioxidative Wirkung auszeichnen. Die Carotinoide wirken der Oxidation von schädlichen LDL entgegen, die erst in ihrer oxidierten Form atherogen werden (vgl. Kap. 4.1.2) [159]. Bonetti et. al haben bereits eine Korrelation zwischen Lipidansammlungen und Anreicherung von Carotinoiden nachgewiesen [160]. Die Anwesenheit von Carotinoiden in atherosklerotischen Plaques lässt sich durch ihren Transportmechanismus erklären: In der Blutbahn werden die Carotinoide mit Hilfe der Lipoproteine, vorwiegend LDL, transportiert. Kommt es zur Phagozytose von LDL durch Makrophagen (vgl. Kap. 4.1.2), so werden die an LDL gebundenen Carotinoide ebenfalls mit phagozytiert [115], [160], [161]. Somit können die Carotinoide neben den Cholesterin-Resonanzen auch als Marker für atherosklerotische Ablagerungen betrachtet werden. Dieses Verhalten konnte anhand der beiden Carotinoid-Peaks in Abbildung 45 belegt werden.

Laut histologischem Befund liegt beim untersuchten Querschnitt von Spender BO-P3 eine fortgeschrittene stenosierende Atherosklerose mit zwei stark ausgeprägten Plaque- und Mineralisierungsbereichen vor (vgl. Abb. 43). Anhand der aufgenommenen Raman-Spektren von Probenposition 2 (vgl. Abb. 45) lässt sich das pathologische Untersuchungsergebnis bestätigen. Darüber hinaus liefern die Spektren eine zusätzliche Erkenntnis, dass es sich dabei um eine höchst gefährliche gemischte Plaqueform handelt. Solche atheromatösen kalzifizierten Läsionen mit einer fibrösen Kappe sind äußerst kritisch in erster Linie aufgrund eines extrem hohen Rupturrisikos.

In Bezug auf die qualitative Charakterisierung der zu analysierenden Probe ist die spontane Raman-Spektroskopie aufgrund ihrer chemischen Spezifität den etablierten bildgebenden Untersuchungsverfahren, wie IVUS, OCT und histologischen Färbungen, deutlich überlegen. Mittels der ebenfalls in Kapitel 4.1.3 beschriebenen MALDI-TOF-

Massenspektrometrie lässt sich zwar eine orts aufgelöste Häufigkeitsverteilung eines bestimmten m/z -Verhältnisses innerhalb der Probe darstellen, aber die Methode ist höchst invasiv und materialverbrauchend. Eine vergleichbare, aber hingegen zerstörungsfreie optische Methode beruht auf der kohärenten Raman-Streuung, CARS, die zur Visualisierung der räumlichen Verteilung einer bestimmten Raman-aktiven Schwingung in der zu untersuchenden Probe dient (vgl. Kap. 2.2.2). Allerdings werden für CARS-Messungen die spektralen Positionen der materialspezifischen Raman-Resonanzen benötigt, die vorher mit der spontanen Raman-Spektroskopie bestimmt werden müssen. Somit ist ein Raman-Spektrum stets notwendig für das bildgebende CARS-Verfahren.

Im Folgenden wird der spektroskopische Ansatz mit der Bildgebung kombiniert, um die Gewebeschnitte weiter zu charakterisieren. Die hier gezeigten CARS- und SHG⁴-Messungen wurden von Henning Hachmeister und Christian Pilger durchgeführt und ausgewertet.

Vor den eigentlichen Messungen wurden fünf Probenpositionen im Querschnitt von Spender BO-P3 markiert (s. Abb. 47a), an denen weiterführende CARS-Messungen erfolgten. Diese Bereiche wurden mit S1-S5 bezeichnet. Da hierbei die CARS-Sensitivität in Bezug auf die Detektion der lipid- und kalziumreichen Areale geprüft wird, ist der Bereich S2 besonders interessant.

Die Kalzium-Peaks mit der höchsten Intensität liegen bei 959 cm^{-1} und 1071 cm^{-1} . Aufgrund der ν^4 -Abhängigkeit der Raman-Intensität erwartet man für die Resonanzen unterhalb von ungefähr 1900 cm^{-1} ein schwaches CARS-Signal (vgl. Kap. 2.2.3). Dabei ist auch die quadratische Konzentrationsabhängigkeit der CARS-Intensität zu berücksichtigen, d. h. geringe Konzentrationen setzen den Kontrast der CARS-Aufnahmen weiterhin herab [162]. Infolgedessen sind für die CARS-Messungen an Kalzifizierungsstellen keine kontrastreichen Aufnahmen zu erwarten. Bei höheren Wellenzahlen liefert CARS dagegen einen sehr guten chemischen Kontrast. Eine häufig verwendete Resonanz ist die von der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung bei 2845 cm^{-1} . Bei der Untersuchung von biologischem Material wird sie verwendet, um die Verteilung der Lipide in der zu untersuchenden Probe zu visualisieren [163].

Da es sich bei Kalzifizierungen um Gewebereiche hoher Kristallinität handelt, bietet sich daher die Frequenzverdopplung (engl. *Second Harmonic Generation*, SHG) an. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der empfindlichen Detektion von asymmetrischen hochgradig linear geordneten Strukturen (z. B. Kollagen-Strängen oder auch kristallinem Kalziumapaptit) [164]. Bei diesem nicht-linearen bildgebenden Verfahren kommt es zur sogenannten Frequenz-Konversion an bestimmten Gewebestrukturen, die die Verdopplung der Anregungsfrequenz zur Folge hat [165]. Das resultierende SHG-Signal zeigt die orts aufgelöste Verteilung der frequenzverdoppelnden Substanz in der vorliegenden Probe.

⁴ Second Harmonic Generation.

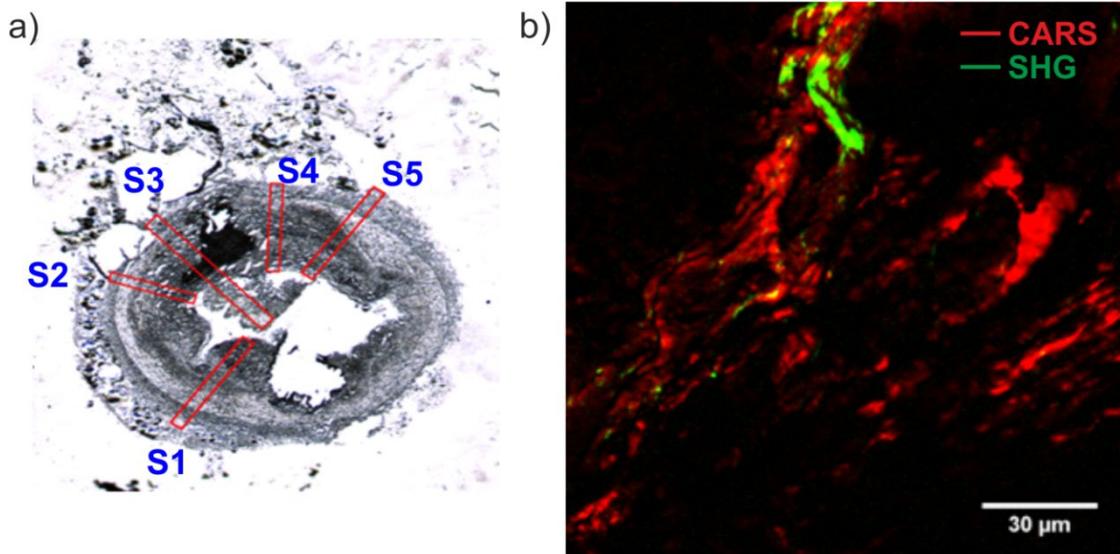


Abb. 47: a) Transmissionsmikroskopiebild des untersuchten Gewebeschnitts von Spender BO-P3 (vgl. Abb. 43). Die roten Rechtecke markieren dabei die mit CARS analysierten Bereiche der Probe (S1-S5). In b) wird eine Kombination aus dem CARS- und SHG-Signal in der ersten Hälfte des Bereiches S2 dargestellt, wobei die hier gezeigte Aufnahme ein über 13 μm summierter z-Stack ist. Das CARS-Signal (rot) wurde mit einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) für die Lipid-Resonanz bei 2845 cm^{-1} aufgenommen (Stokes-Laser: fokale Leistung 14 mW, Pump-Laser: fokale Leistung 28 mW). Das SHG-Signal (grün) stammt von geordneten, aber nicht-zentrosymmetrischen Gewebestrukturen (Stokes-Laser: 50 mW). Die CARS- und SHG-Messungen wurden von Christian Pilger und Henning Hachmeister durchgeführt und ausgewertet.

Sowohl CARS- als auch SHG-Messungen wurden am Querschnitt von Spender BO-P3 in der ersten Hälfte der Stelle S2 durchgeführt. Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen den kristallinen Strukturen und der Lipid-Verteilung festzustellen, wurde die Kombination beider Messsignale in einer Abbildung dargestellt (s. Abb. 47b, CARS: rot, SHG: grün). Dabei handelt es sich um einen über 13 μm summierten z-Stack, weil das SHG-Signal einer einzelnen Aufnahme sehr schwach war.

In der Abbildung 47b ist das SHG-Signal in grün dargestellt. Es lassen sich sowohl vereinzelt kleine Strukturen als auch größere Agglomerate identifizieren, bei denen es sich vermutlich entweder um lokale Verkalkungsherde oder kollagenreiche fibröse Plauekappen handelt. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass aus der *Media* eingewanderte glatte Muskelzellen ebenfalls ein SHG-Signal liefern, da diese Muskelzellen auch für die Synthese von Kollagen verantwortlich sind [166].

Vorwiegend korreliert das Signal der kristallinen Strukturen mit den im Gewebe vorhandenen Fettsubstanzen, die anhand der Lipid-Resonanz bei 2845 cm^{-1} mit CARS identifiziert wurden (s. Abb. 47b, rot). Es gibt aber auch sehr lipidreiche Areale, in denen gar kein SHG-Signal detektierbar ist. Allerdings ist auch eine eindeutige Identifizierung der Kalzifizierungen mittels SHG nur in Kombination mit anderen Methoden, wie z. B.

mit der spontanen Raman-Spektroskopie, möglich. Infolgedessen sind auch die Unterscheidung vor allem von kalzifizierten und fibrotischen Plaqueformationen und damit auch die Abschätzung des bestehenden Rupturrisikos für den jeweiligen Patienten alleine anhand von SHG-Aufnahmen nicht möglich. Auch dabei müssten Raman-Messungen die fehlenden Informationen liefern.

Bei der oben genannten Lipid-Resonanz bei 2845 cm^{-1} handelt sich um eine Schwingung, die sowohl für gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren charakteristisch ist. Demzufolge ist anhand dieser einen Resonanz keine Differenzierung zwischen den beiden Fettsäuretypen bei CARS-Messungen möglich.

Um die chemische Spezifität der kohärenten Anti-Stokes Raman-Streuung zur Differenzierung von gesättigten und ungesättigten Lipiden zu erreichen, würde sich hyperspektrales CARS anbieten [167]. Anhand einer atherosklerotischen Maus haben Lim et al. die Anwendbarkeit dieser Untersuchungsmethode zur Analyse der Lipid-spezifischen Verteilung innerhalb einer atherosklerotischen Plaque bereits demonstriert [168]. Hyperspektrales CARS beruht auf der Aufnahme einer Serie von CARS-Bildern im C-H-Schwingungsbereich (ca. $\omega_1 = 2700\text{ cm}^{-1}$ bis $\omega_n = 3100\text{ cm}^{-1}$), wobei die genaue Resonanz von der Form und Struktur der Lipide abhängt. Dabei bleibt die Stokes-Wellenlänge konstant, während die Wellenlänge des Pump-Lasers im oben genannten Schwingungsbereich mit einer Schrittweite von ca. $2\text{-}5\text{ cm}^{-1}$ verschoben wird (s. Abb. 48).

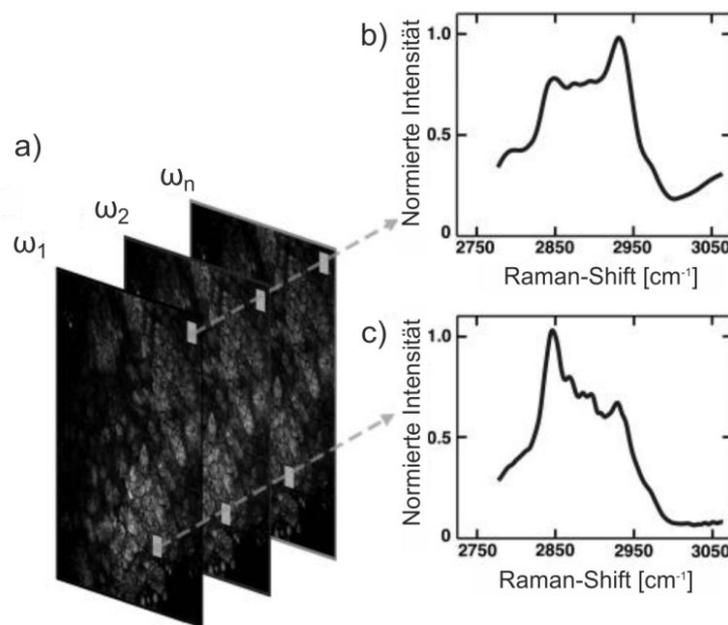


Abb. 48: Funktionsweise der hyperspektralen kohärenten Anti-Stokes Raman-Streuung-Mikroskopie. a) Im ersten Schritt wird eine Reihe von CARS-Bildern von einer zu untersuchenden Probenoberfläche bei unterschiedlichen Wellenzahlen ω_n aufgenommen. Auf diese Weise ergibt sich ein 3D-Stack (x, y, n). An jedem Pixel in der abgerasterten xy -Ebene wird die dazugehörige Intensität detektiert. Die Intensitätswerte, aufgenommen für verschiedene Wellenzahlen von ω_1 bis ω_n , setzen sich zu einem CARS-Spektrum für das jeweilige Pixel zusammen. In b) ist ein exemplarisches Spektrum von Proteinen und in c) von Lipiden gezeigt (adaptiert aus [168]).

An jedem Pixel der abgerasterten Fläche wird eine spektrale Intensität für einen festen Schwingungswert ω_n gemessen. Nach Variation der verschiedenen Wellenzahlen innerhalb des ausgewählten Bereichs lassen sich einzelne Intensitätswerte eines Pixels zu einem CARS-Spektrum zusammenfassen. Dabei ist zu beachten, dass die eingestellten Laserleistungen für alle Wellenzahlen gleichgehalten werden müssen, damit die Intensitäten der einzelnen CARS-Bilder untereinander vergleichbar sind. Da das CARS-Signal proportional zum Quadrat der Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi^{(3)}$ ist und letztere aus einem resonanten und nicht-resonanten Anteil besteht, handelt es sich bei einem CARS-Spektrum um eine Mischung aus einem klassischen Raman-Spektrum und dem nicht-resonanten Beitrag, der keine spektrale Abhängigkeit aufweist [169]. Dies führt zu Unterschieden in der Form und Position der einzelnen Resonanzen im resultierenden CARS-Spektrum. Mithilfe geeigneter Algorithmen lässt sich das Raman-Signal aus den aufgenommenen CARS-Daten extrahieren und auswerten. Daraus kann man dann Rückschlüsse auf die Natur der Fettsäuren ziehen und die Lipid-Zusammensetzung der Plaques genauer charakterisieren.

Obwohl atherosklerotische Läsionen sich vor allem in der *Intima* der Gefäßwand konzentrieren, kann lipidreiches Material im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auch in die tieferen Schichten der betroffenen Arterie eindringen und sich dort akkumulieren (vgl. Kap. 4.1.2 und 4.1.3). Infolgedessen sind CARS-Aufnahmen aller drei Arterien-schichten (*Intima*, *Media*, *Adventitia*) sinnvoll, um die Verteilung von Lipiden im untersuchten Gewebe beurteilen zu können.

Deshalb wurden CARS-Bilder über alle drei Schichten an der Position S2 (s. Abb. 47a) aufgenommen. Ein exemplarisches Beispiel dafür in Abbildung 49 gezeigt. Anhand der aufgenommenen CARS-Daten erkennt man, dass die Lipidkonzentration in den drei Gewebeschichten, aber auch innerhalb einer Schicht sehr unterschiedlich ist. Die höchste Lipidkonzentration findet man in der *Intima*. Das ist auch zu erwarten, denn die Einlagerung von Blutfetten erfolgt vom Gefäßlumen aus gesehen von innen nach außen. Im gezeigten *Intima*-Ausschnitt der zu untersuchenden Probe gibt es kaum dunkle Areale, die sich sehr lipidarmen oder sogar lipidlosen Bereichen zuordnen lassen. Daraus folgt, dass die Lipidanreicherung in der inneren Arterien-schicht bereits stark ausgeprägt ist und einen pathologischen Charakter angenommen hat. Da die *Media* und die *Adventitia* zum größten Teil aus Muskelzellen bestehen (vgl. Kap. 4.1.2), wird in gesundem Gewebe in diesen Arterien-schichten keine nennenswerte Lipidkonzentration erwartet. In Abbildung 49 erkennt man jedoch Bereiche der *Media*, die einen für diese Schicht hohen Lipidanteil aufweisen. In der *Adventitia* sind fettreiche Substanzen zwar auch vorhanden, deren Konzentration ist aber nicht hoch. Basierend auf der Verteilung der Lipide im Querschnitt von Spender BO-P3 lässt sich auf ein fortgeschrittenes Stadium der Atherosklerose schließen, da auch die *Media* und teilweise die *Adventitia* bereits betroffen sind.

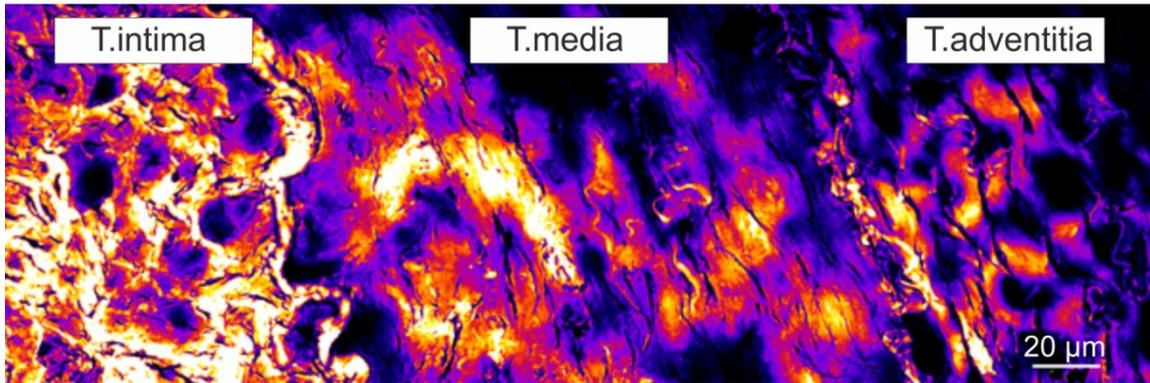


Abb. 49: CARS-Abbildung der Lipidverteilung im Querschnitt von Spender BO-P3 an der Stelle S2 über die drei Arterienbereiche: *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia*. Helle Bereiche stehen für lipidreiche Areale. Das CARS-Signal wurde für die Lipid-Resonanz bei 2845 cm^{-1} , mit einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) und einer fokalen Leistung des Stokes-Lasers von 14 mW und des Pump-Lasers von 28 mW aufgenommen. Die Aufnahmen wurde von Christian Pilger und Henning Hachmeister gemacht und ausgewertet.

Der Probenbereich S2, der bis jetzt mit CARS untersucht wurde, wird im Folgenden auch durch die spontane Raman-Spektroskopie eingehender analysiert. Innerhalb jeder Arterien-schicht erfolgte die Aufnahme von jeweils zehn Raman-Spektren an sechs repräsentativen Positionen. Daraufhin wurde über die zehn Raman-Spektren der einzelnen Positionen gemittelt, so dass sich ein Spektrum pro Arterien-schicht ergibt (s. Abb. 50).

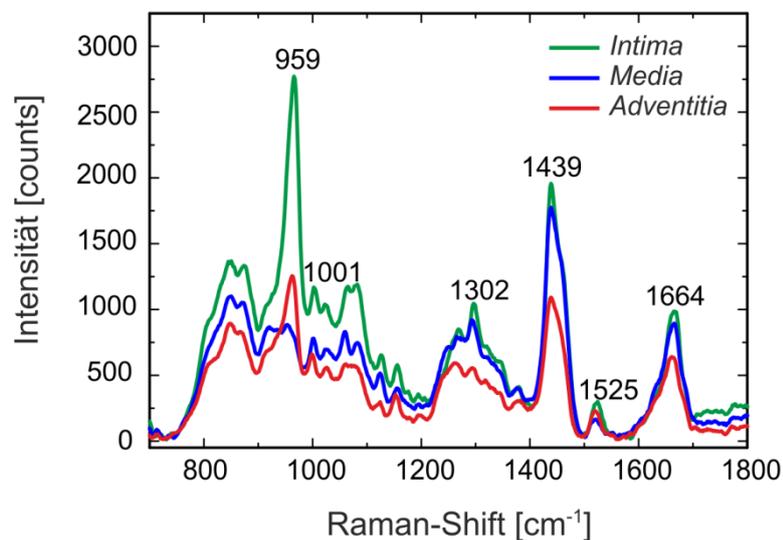


Abb. 50: Exemplarische Raman-Spektren der drei Arterien-schichten an der Stelle P2: *Tunica intima* (grün), *Tunica media* (blau) und *Tunica adventitia* (rot). Das Hintergrundsignal wurde mit Hilfe des Lieber-Algorithmus abgezogen. Die Daten wurden mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW und einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2) aufgenommen. Die Integrationszeit beträgt 90 s und jedes hier dargestellte Spektrum ergibt sich aus der Mittelung über zehn Einzelspektren an jeder der sechs repräsentativen Ortspunkte, also insgesamt 60 Einzelspektren. Die eingezeichneten Peaks sind im Detail in der Tabelle 8 identifiziert.

In den aufgenommenen Raman-Spektren ist zu erkennen, dass die höchste Signalintensität der stark ausgeprägten Peaks in der *Intima* detektiert wird (s. Abb. 50, grüne Kurve). Im zugehörigen Raman-Spektrum weist die Kalzium-Resonanz bei 959 cm^{-1} die höchste Intensität auf. In der *Media* ist sie im Vergleich zu anderen Peaks zwar auch hoch (s. Abb. 50, blaue Kurve), aber bezogen auf die Resonanz in der *Intima* nimmt die Peakintensität um Faktor 2.3 ab. In der *Adventitia* ist der Peak sehr schwach ausgeprägt (s. Abb. 50, rote Kurve). Dies deutet darauf hin, dass die Mineralisierung sich vor allem auf die inneren Bereiche (*Intima* und *Media*) erstreckt.

Aus den aufgenommenen Raman-Spektren der drei Arterien-schichten ist ersichtlich, dass die Spektren aller Schichten die gleichen Peaks enthalten (s. Abb. 50), nur deren Intensitäten bzw. Verhältnisse zwischen den einzelnen Peaks ändern sich. Bemerkenswert ist die signifikante Intensitätsabnahme des Peaks bei 1439 cm^{-1} in der *Adventitia*. Dabei handelt es sich um die CH_2 -Schwingung, die für alle Fettsäuren (sowohl gesättigte als auch ungesättigte) charakteristisch ist. Daraus kann man auf eine im Vergleich zur *Intima* und *Media* verringerte Gesamtanzahl an Fettsäuren in der *Adventitia* schließen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Lipidakkumulation in der *Intima* anfängt, sich dann auf die *Media* und erst im späteren Krankheitsverlauf auf die *Adventitia* erstreckt. Dieses Verhalten zeigte sich ebenfalls in den CARS-Aufnahmen (vgl. Abb. 49, dunkle Bereiche in der *Adventitia*). Des Weiteren weisen Unterschiede in den Intensitäten der Lipid-Resonanzen bei 1439 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} in der *Intima* und der *Media* auf ein fortgeschrittenes Stadium der Atherosklerose hin. Die Lipidakkumulation ist auch auf die inneren Bereiche der Gefäßwand überggesprungen. Das Peakverhältnis I_{1439}/I_{1664} , das den Sättigungsgrad der vorliegenden Fettsäuren widerspiegelt, ist in allen drei Raman-Spektren größer eins. Somit überwiegt die Anzahl gesättigter Fettsäuren in allen drei Arterien-schichten. Obwohl gesättigte Fettsäuren aufgrund ihrer chemischen Struktur nicht so schnell (im Vergleich zu ungesättigten Fettsäuren) Reaktionen mit ihrer Umgebung eingehen, führt deren Zunahme zum Anstieg von schädlichem LDL [170].

Die Auswertung der Raman-Spektren liefert also die für die Diagnose und die Therapie wertvollen Informationen über das zu untersuchende Gewebe. Im Vergleich zu histologischer Färbung, IVUS oder OCT weist die spontane Raman-Spektroskopie eine hohe chemische Spezifität auf, die eine zuverlässige Identifizierung unterschiedlicher Plaqueformen ermöglicht, selbst wenn die weichen Plaquekomponenten durch eine Kalzifizierung verdeckt sind. Darüber hinaus ist eine direkte Unterscheidung zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren anhand des Verhältnisses der dazugehörigen Raman-Peaks ohne zusätzlichen Aufwand möglich, wie es bei hyperspektralem CARS der Fall ist. Die in Bezug auf die Spezifität vergleichbare, aber destruktive MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann somit durch eine Kombination der minimal-invasiven spontanen Raman-Spektroskopie und CARS ersetzt werden. Dies würde in einem geringeren Präparationsaufwand und kürzeren Messzeiten resultieren.

4.1.7 Zusammenfassung und Ausblick

Es gibt bereits etablierte Methoden zur Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen. Im Allgemeinen wird zwischen bildgebenden und Biopsie-basierten Verfahren unterschieden. In der Regel wird zur Charakterisierung atherosklerotischer Gefäßwandabschnitte eine Kombination aus beidem verwendet, wobei keine dieser Methoden eine ausreichende biochemische Spezifität aufweist, um unterschiedliche Plaueformen zu identifizieren.

Da die spontane Raman-Spektroskopie sich durch ihre molekulare Spezifität auszeichnet und darüber hinaus zerstörungsfrei ist und keiner aufwendigen Probenpräparation bedarf, wurde im Rahmen dieser Arbeit ihre Anwendbarkeit auf die Analyse humaner Koronarschnitte geprüft. Anhand der vorgestellten Messungen konnte gezeigt werden, dass die mittels der spontanen Raman-Spektroskopie gewonnenen Daten im Vergleich zu den bereits bewährten Analysemethoden zusätzliche und eindeutige Informationen über die vorliegende Probe liefern.

Eine Probencharakterisierung durch die spontane Raman-Spektroskopie wurde anhand der exemplarischen Aorta-Gewebeprobe BO-P3 an Positionen mit verschiedenen Ausprägungen der Atherosklerose vorgestellt. Eine Vorcharakterisierung der Probenoberfläche erfolgte im Rahmen einer histologischen Untersuchung. Daraufhin wurden Raman-Spektren von verschiedenen Probenbereichen aufgenommen. Basierend auf den spektroskopischen Daten konnte man zwischen unterschiedlichen Plaquearten (vgl. Kap. 4.1.2) differenzieren. Darüber hinaus wurden diese Bereiche auch mit den bildgebenden optischen Methoden, wie CARS und SHG, untersucht. Durch die CARS-Messungen konnten lipidreiche weiche Plaques identifiziert werden. Der Nachweis von kalzifizierten Probenarealen war aufgrund eines schwachen Kontrastes im verwendeten Wellenzahlbereich nicht möglich. Durch die SHG-Messungen konnten voraussichtlich kristalline Bereiche detektiert werden, eine eindeutige Klassifizierung der vorhandenen Substanzen war jedoch ebenfalls nicht möglich. Erst die Anwendung der spontanen Raman-Spektroskopie ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der kalzifizierten Probenbereiche.

Des Weiteren wurden Raman-Spektren von den Bereichen *Intima*, *Media* und *Adventitia* aufgenommen. Aus den Intensitäten der Lipid-Resonanzen konnte darauf geschlossen werden, dass die Lipidakkumulation vor allem in der *Intima* erhöht ist, sich aber bereits auch auf die inneren Bereiche der Gefäßwand ausgeweitet hat. Dieses Verhalten deutet auf ein sehr fortgeschrittenes Stadium der Atherosklerose hin und konnte auch anhand der orts aufgelösten CARS-Aufnahmen von den genannten Bereichen bestätigt werden.

Folglich könnten die durch Raman-Messungen gewonnenen Informationen zusätzlich in die Bestimmung der Komplikationsrate eingehen, um die Zuverlässigkeit der Abschätzung zu verbessern. Des Weiteren könnte die genaue Kenntnis der Lipid-

Komposition in den Plaques die Wahl des patientenspezifischen Therapieansatzes beeinflussen, denn dieser hängt in erster Linie von der Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques ab. Ferner könnte die Charakterisierung von Lipiden auch bei der Weiterentwicklung wirksamerer Medikamente und deren Optimierung nützlich sein.

Kombiniert man die spontane Raman-Spektroskopie mit einem endoskopischen Ansatz, so könnte die Pathodiagnostik der Blutgefäße in Zukunft auch *in vivo* erfolgen. Dabei muss allerdings folgender Aspekt berücksichtigt werden. Das für die Gewebeuntersuchungen am besten geeignete Infrarotlicht (vgl. Kap. 2.2.3 und 4.1.3) wird durch Blut und seine Bestandteile stark absorbiert. Dies würde niedrigere Raman-Intensitäten und ein verringertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zur Folge haben. Unter Verwendung einer nachfolgenden Auswertung durch multivariate statistische Verfahren wären die gemessenen Spektren jedoch weiterhin aussagekräftig.

4.2 Untersuchung der Zusammensetzung von lipidreichen Kompartimenten in Mikroalgen

Im folgenden Kapitel werden die an einzelnen lipidreichen Mikroalgen durchgeführten Raman-Messungen vorgestellt. Im Rahmen der Motivation in Kap. 4.2.1 werden die Vorteile dieser Algen als regenerativer Energiequellen dargestellt. Im darauffolgenden Kapitel 4.2.2 wird auf den genaueren Lipidakkumulationsmechanismus eingegangen. In den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 werden die den Raman-Messungen vorausgehenden Probenpräparation und Probencharakterisierung beschrieben. Die Messungen an Lipiden in einzelnen Algen und ihre Auswertung in Bezug auf die chemische Zusammensetzung und somit auf ihre potenzielle Nutzbarkeit für biotechnologische Anwendungen werden in Kapitel 4.2.5 vorgestellt. Anschließend werden die experimentell gewonnenen Erkenntnisse unter Berücksichtigung der Fragestellung in Kapitel 4.2.6 zusammengefasst.

4.2.1 Motivation

Unsere Energiebasis wird heutzutage überwiegend durch fossile Brennstoffe, wie Kohle oder Erdgas, und durch die Atomenergie gebildet [171]. Beide Energiequellen sind nur im begrenzten Maße vorhanden und es treten zusätzlich begleitende große Umweltbelastungen auf. Durch die Verbrennung von Erdöl oder Kohle kommt es zur Emission giftiger Schadstoffe, die die Erdatmosphäre und damit auch das Klima negativ beeinflussen [18]. Die Kernkraft ist ebenfalls mit hohen Sicherheitsrisiken für die Umwelt verbunden und das Problem der Lagerung des atomaren Abfalls bleibt weiterhin ungelöst. Infolgedessen rückt eine nachhaltige Energieversorgung immer mehr in den Fokus. Darunter versteht man die Gewinnung von Treibstoffen aus erneuerbaren Quellen, die sich durch minimalen Schadstoffausstoß auszeichnen [18], [171]. Die zunehmende Wichtigkeit dieses Forschungsgebiets spiegelt sich auch in der Erlassung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes zur Förderung alternativer Energiequellen im Jahre 2000 wider. Eine alternative Quelle ist z. B. (nachwachsende) Biomasse, aus der Biodiesel, Bioethanol, Biowasserstoff und/oder Biogas gewonnen werden können. Unter Biomasse versteht man die von einem Organismus bereitgestellten Stoffe (Lipide, Kohlenhydrate etc.), die energietechnisch genutzt werden können, wobei meistens die Trockenmasse zu Rohstoffen verarbeitet wird. Als Biomasse-Produzenten dienen momentan überwiegend energiereiche Pflanzen, wie Mais oder Raps [172]. Der bedeutende Vorteil der nachwachsenden Rohstoffe ruht auf dem geschlossenen Kohlendioxid-Kreislauf: Es kann nur die CO₂-Menge beispielsweise im Biodiesel verbrannt werden, die von der Pflanze während der Wachstumsphase aufgenommen wurde. Dies hat eine verminderte CO₂-

Emission im Vergleich zum konventionellen Diesel zur Folge. Darüber hinaus ist der Biodiesel nahezu schwefelfrei und biologisch leicht abbaubar [173].

Seit der letzten Dekade sind Algen als potentielle Energieträger der Gegenstand intensiver Forschung [174]. Im Unterschied zu Energiepflanzen bedürfen sie keiner landwirtschaftlich nutzbaren Fläche und konkurrieren demzufolge nicht mit der Nahrungsmittelproduktion. Um den Flächenbedarf geringer zu halten, kann die Algenzucht in (offenen) Tanks erfolgen, wobei eine ausreichende Lichtversorgung gewährleistet werden muss [175]. Des Weiteren ist die Verwendung von Algen vielversprechender, da diese im Vergleich zu Pflanzen eine höhere Flächenproduktivität haben [176]. Obgleich sowohl Landpflanzen als auch Algen Kohlenstoffdioxid, Sonnenlicht und Wasser zur Biomasse umwandeln, läuft die CO₂-Verwertung durch Algen wesentlich effizienter ab. Zum Beispiel beträgt der jährliche Biomasse-Ertrag von Mais maximal 40 Tonnen pro Hektar, die jährlich gebildete Biomasse von Algen liegt dagegen bei bis zu 150 Tonnen pro Hektar [171].

Der Hauptbestandteil der Algen-Biomasse wird von Fettsäuren gebildet. Zur Herstellung von Biokraftstoffen lassen sich beispielsweise die in den Algen akkumulierten Lipide unter Zugabe von Methanol und eines geeigneten Katalysators durch eine Umesterungsreaktion zu Fettsäuremethylestern (Biodiesel) verarbeiten. Bereits im November 2011 erfolgte der erste kommerzielle Flug mit Algenkraftstoff: Eine Maschine der United Airlines flog von Houston nach Chicago mit Treibstoff, der zu 60% aus herkömmlichem Kerosin und zu 40% aus Algen-Kerosin bestand [177].

Zur Produktion von Biokraftstoff sind vor allem solche Algen von Interesse, die eine hohe Biomasse-Produktivität mit einem hohen Lipidgehalt kombinieren („oleaginous microalgae“). Bei einzelnen Algensträngen kann er unter günstigen Umständen bis zu 60% der Trockenmasse betragen [19].

In der Wachstumsphase der Algen lässt sich die chemische Zusammensetzung der Biomasse durch verschiedene Parameter (Lichtmenge, Nährstoffe) in einem bestimmten Rahmen steuern. Unter Stressbedingungen, wie Limitierung gewisser Nährstoffe, werden beispielsweise gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren in den Algen überwiegend in Form von Triacylglyceriden intrazellulär akkumuliert. Die darin enthaltenen Fettsäuren sind Ausgangsstoffe für die Biokraftstoffherstellung und damit von wirtschaftlichem Interesse [178].

Um die Triacylglycerid-Produktion während der Anreicherungsphase möglichst effizient zu gestalten, müssen die synthetisierten Lipide in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen eingehend untersucht und charakterisiert werden. Die etablierten Methoden in der Lipidomik, wie beispielsweise chromatographische Verfahren, können nicht an einzelnen Zellen vorgenommen werden und setzen die vorhergehende Extraktion der Lipide voraus. Bei der destruktiven Analyse des Lipid-Gemisches geht die Information über die Zusammensetzung der Lipide einzelner Zellen und damit über die Beteiligung einzelner Algen an der gesamten Lipid-Produktion

verloren. Es wird also immer über alle möglichen Entwicklungszustände innerhalb einer Algenkultur gemittelt. Eine zeitlich aufgelöste Analyse an einer einzelnen lebenden Zelle ist somit auch nicht möglich.

Die spontane Raman-Spektroskopie eignet sich dahingegen sehr gut zur Analyse einzelner Algen. Des Weiteren weist sie eine hohe Sensitivität bezüglich der leicht unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen verschiedener Lipide auf. Mit dem in dieser Arbeit aufgebauten Raman-System lassen sich eine hohe räumliche Auflösung und Sensitivität erreichen, um die Lipid-Zusammensetzung einzelner Zellen zu vermessen. Die Aufnahmedauer ist dabei so kurz, dass die zeitliche Entwicklung der Lipid-Komposition spektroskopisch verfolgt werden kann. Hier kommt unter anderem zum Tragen, dass die zu analysierenden Proben auch in ihrer nativen Umgebung untersucht und die Messungen schnell und zerstörungsfrei *in vivo* durchgeführt werden können.

4.2.2 Lipidakkumulation in *Monoraphidium neglectum*

Mikroalgen sind eukaryotische einzellige Organismen, die Chlorophyll enthalten und infolgedessen zur Photosynthese fähig sind. Sie bestehen überwiegend aus Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und Pigmenten. Trotz der ähnlichen Zellbestandteile gibt es eine Vielzahl von Algen, die aufgrund ihrer Evolutionsgeschichte unterschiedliche Eigenschaften besitzen. In Bezug auf die energietechnische Nutzung liegt der Fokus insbesondere auf Algenarten, die eine hohe Lipid-Produktivität aufweisen.

Lipide bestehen aus Fettsäuren und deren Derivaten, primär Phospholipiden und Triglyceriden [179]. Unter Fettsäuren versteht man Carbonsäuren mit einer Kettenlänge mit mindestens 4 Kohlenstoffatomen, die an einem Ende eine hydrophile Carboxylgruppe (-COOH) und am anderen Ende eine lipophile C-H-Gruppe haben [180]. Dabei hängt das lipophile Verhalten der jeweiligen Fettsäure unter anderem von der Anzahl der Kohlenstoffatome ab: Je länger die Kette ist, desto stärker ist der Lipid-Charakter ausgeprägt. Fettsäuren können sowohl frei als auch als Bestandteile größerer Lipide vorliegen. Im Allgemeinen wird zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren unterschieden. Bei gesättigten Carbonsäuren sind alle Kohlenstoffatome durch eine Einfachbindung miteinander verbunden, d. h. jedes Kohlenstoffatom ist mit vier Wasserstoffatomen abgesättigt. Bei ungesättigten Fettsäuren liegen neben Einfachbindungen auch Doppelbindungen zwischen Kohlenstoffatomen vor: Pro Doppelbindung können zwei Wasserstoffatome weniger gebunden werden, d. h. jedes Kohlenstoffatom hat nur 3 Bindungspartner [179]–[181].

Die Fettsäuren werden nach der Zahl der Kohlenstoffatome und der Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen benannt. Beispielsweise handelt es sich bei

C16:0 (Palmitinsäure) um eine gesättigte Fettsäure, die aus 16 Kohlenstoffatomen besteht und keine Doppelbindung aufweist (s. Abb. 51a). C18:1 (Oleinsäure) ist dagegen eine einfach ungesättigte Fettsäure, die aus 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung besteht (s. Abb. 51b). Die erweiterte Bezeichnung C18:1 (ω -9) liefert die zusätzliche Information über die Position der Doppelbindung, die sich in diesem konkreten Fall am neunten Kohlenstoffatom, gezählt vom Methylende der Kohlenstoffkette, befindet (s. Abb. 51a).

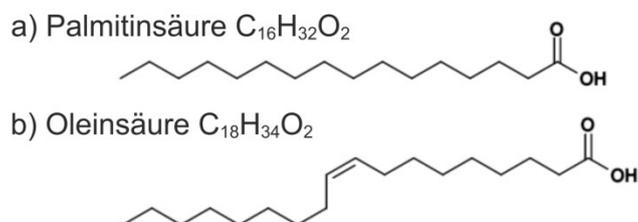


Abb. 51: Chemische Struktur der gesättigten Palmitinsäure (a) und der einfach ungesättigten Oleinsäure (b), wobei sich die Doppelbindung am 9. Kohlenstoffatom, vom Methylende der Fettsäure gezählt, befindet.

Während gesättigte Fettsäuren eine lineare Form annehmen (s. Abb. 51a), haben ungesättigte Fettsäuren einen durch die Doppelbindung hervorgerufenen Knick in der Kohlenstoffkette (s. Abb. 51b). Die chemische Struktur der jeweiligen Carbonsäure bestimmt dabei ihre Eigenschaften: Im Unterschied zu gesättigten Fettsäuren bleiben ungesättigte Fettsäuren aufgrund ihrer weniger rigiden Struktur auch bei niedrigen Temperaturen flüssig und tendieren zu schnellen chemischen Reaktionen mit ihrer Umgebung [180].

Es wurde bereits erwähnt, dass Fettsäuren die Bausteine für Phospholipide und Triglyceride bilden. Phospholipide sind Hauptbestandteile von Doppelmembranen, die vor allem die Abgrenzung der Zelle von ihrer Umgebung und die Zellstabilität gewährleisten [182]. Triglyceride dienen als intrazelluläre Speicher der überschüssigen Energie, die in einem gewissen Rahmen eine Unabhängigkeit von der Nahrungsaufnahme aus der Umwelt über eine bestimmte Zeit ermöglichen [181]. Für biotechnologische Anwendungen sind Triglyceride deshalb als Energiequelle von großem Interesse. Deren chemische Struktur ist schematisch in Abbildung 52 gezeigt: Triglyceride entstehen bei der Veresterung eines Glycerin-Moleküls mit drei Fettsäuren. In Abhängigkeit von den beteiligten Carbonsäuren gibt es unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten für den Aufbau eines Triglycerid-Moleküls. Sind alle drei Fettsäuren gleich, so spricht man von einem Triacylglycerid (TAG).

Ungesättigte Carbonsäuren als TAG-Bestandteile hätten den Vorteil, dass sie auch bei niedrigeren Temperaturen flüssig bleiben. Somit würden sie die sogenannte Filtrierbarkeitsgrenze⁵ des daraus hergestellten Kraftstoffes herabsetzen, welche die

⁵ Temperaturgrenze, bei der der Prüffilter durch ausgefallene Paraffine im Dieselmotorkraftstoff unter definierten Bedingungen verstopft wird.

Kälteeigenschaften eines Kraftstoffes bestimmt [184]. Allerdings führen ungesättigte Fettsäuren infolge von Oxidationsreaktionen mit ihrer Umgebung eine unerwünschte Stabilitätsverringerng des Öls herbei [185]. Aus diesem Grund sind in Bezug auf die Stabilität des synthetisierten Öls vorrangig einfach ungesättigte und gesättigte Fettsäuren in Form von Triacylglyceriden von Bedeutung.

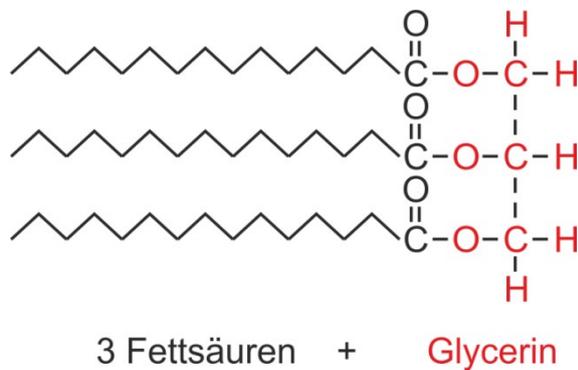


Abb. 52: Chemische Struktur eines Triglycerids, das aus einem Glycerin-Molekül mit 3 Fettsäuren besteht. Das Glycerin kann mit unterschiedlichen aliphatischen Carbonsäuren (mit verschiedener Kettenlänge der Alkan-Kette und mit unterschiedlichem Sättigungsgrad) verestert werden (adaptiert aus [183]).

Ungesättigte Carbonsäuren als TAG-Bestandteile hätten den Vorteil, dass sie auch bei niedrigeren Temperaturen flüssig bleiben. Somit würden sie die sogenannte Filtrierbarkeitsgrenze⁶ des daraus hergestellten Kraftstoffes herabsetzen, welche die Kälteeigenschaften eines Kraftstoffes bestimmt [184]. Allerdings führen ungesättigte Fettsäuren infolge von Oxidationsreaktionen mit ihrer Umgebung eine unerwünschte Stabilitätsverringerng des Öls herbei [185]. Aus diesem Grund sind in Bezug auf die Stabilität des synthetisierten Öls vorrangig einfach ungesättigte und gesättigte Fettsäuren in Form von Triacylglyceriden von Bedeutung.

Je nach Kultivierungsbedingungen und Wachstumsphase können Lipide in verschiedenen Formen (z. B. als freie Fettsäuren) in den Algen vorliegen. Befinden sich beispielsweise zu viele freie Fettsäuren in der Zelle, so kann dies unter anderem zur Schädigung der Phospholipid-Membran oder zur Störung der Lipid-Signalwege führen [186]. Um dies zu verhindern, greift ein zellinterner Schutzmechanismus ein, der dafür sorgt, dass die überschüssigen freien Fettsäuren in Form von TAGs akkumuliert werden. Bei Bedarf können TAGs durch Lipasen in ihre Bestandteile hydrolysiert werden und die darin gespeicherte Energie steht intrazellulären Prozessen wieder zur Verfügung [187]. Da es sich bei TAGs um ungeladene (komplett hydrophobe) Lipide handelt, bilden diese statt Doppelschichten, wie es bei Phospholipiden der Fall ist, dreidimensionale Lipid-Tröpfchen (engl. *Lipid Droplets*, LD). Die Größe von LD variiert zwischen 50 nm und 30 µm je nach Algenart, Wachstumsstadium und Kultivierungsbedingungen. Sie bestehen aus einem Neutrallipidkern (TAGs selbst), der von einer Monolage polarer Lipide (Phospholipide) und von Proteinen umgeben ist [188]. Diese Schutzmembran dient der

⁶ Temperaturgrenze, bei der der Prüffilter durch ausgefallene Paraffine im Dieselmotorkraftstoff unter definierten Bedingungen verstopft wird.

Abgrenzung der TAGs von der wässrigen zellulären Umgebung (Zytoplasma). Des Weiteren können auch Carotinoide und freie Fettsäuren in LD vorkommen.

Unter Stressbedingungen können manche Algenarten Lipide, vorwiegend TAGs, verstärkt synthetisieren und akkumulieren [189], [190]. Als sogenannte „Lipid-Trigger“ können sowohl externe Stressfaktoren, die durch die Umgebung (z. B. Stickstoff- oder Phosphorlimitierung) hervorgerufen werden, als auch interne Stressfaktoren (z. B. Inhibition der Stärke-Synthese) agieren [191], [192]. Die Verringerung der Menge an verwertbarem Stickstoff verlangsamt beispielsweise das Zellwachstum und die Proteinsynthese. Daraufhin beginnen die betroffenen Zellen, die dabei überschüssig gewordene Energie in Form von TAGs anzureichern. Die Bildung von LD ist ein reversibler Prozess und kann somit gezielt gesteuert werden: Ohne Einwirkung von Stressfaktoren beobachtet man einen schnellen Abbau der Lipid-Tröpfchen bereits innerhalb der ersten 48 Stunden [188]. Dementsprechend lässt sich die Produktion von Speicherlipiden durch zweckgerichtete Optimierung der Kultivierungsparameter (Temperatur, Belichtung, Nährstoffe) beeinflussen und vor allem steigern.

Die folgenden Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Olaf Kruse durchgeführt. Im Rahmen der Dissertation von Christian Bogen wurden über 500 verschiedene Algenarten untersucht [178]. Der Süßwasser-Algenstrang, der sich dabei am vielversprechendsten in Bezug auf die Anreicherung von TAGs herausgestellt hat, ist *Monoraphidium neglectum*. Er hat eine durchschnittliche laterale Ausdehnung von ca. 10 µm, eine Dicke von ca. 8-10 µm [178] und weist einen für Mikroalgen typischen Aufbau auf: Die Zellkompartimente, wie der Zellkern (Zellteilung, Proteinsynthese), Mitochondrien (Energieproduktion in Form von Adenosintriphosphat), Chloroplasten (Photosynthese), Stärke-Körner (Kohlenhydratspeicher) und LD (Lipidspeicher), sind von einer Zellmembran umgeben (s. Abb. 53).

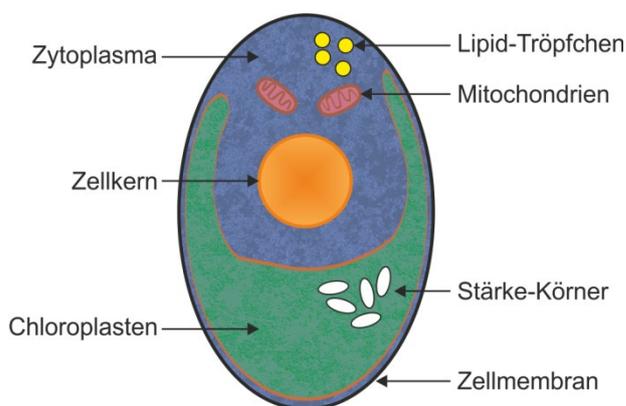


Abb. 53: Schematische Abbildung einer Mikroalge vom Typ *Monoraphidium neglectum* mit den einzelnen Zellkomponenten: Zellmembran, Zellkern, Chloroplasten, Mitochondrien, Stärke-Körner und Lipid-Tröpfchen.

M. neglectum ist robust gegenüber äußeren Einflüssen und zeichnet sich unter anderem durch eine hohe Salztoleranz aus. Dies lässt die Möglichkeit zu, für die Kultivierung eine Mischung aus Süß- und Meerwasser zu benutzen. Demzufolge ließe sich die Alge direkt in Küstennähe ohne großen industriellen und finanziellen Aufwand züchten. Der

durchschnittliche Salzgehalt des Meerwassers liegt bei 3.5% [193], während *M. neglectum* bis zu 1% Salzgehalt immer noch Biomasse produzieren kann (s. Abb. 54) [178]. Die Zellen überstehen zwar eine höhere Salzkonzentration als 1%, es kommt dabei jedoch zu einer verringerten Biomassezunahme. Dadurch reduziert sich auch die Menge verwertbarer Biomasse [178].

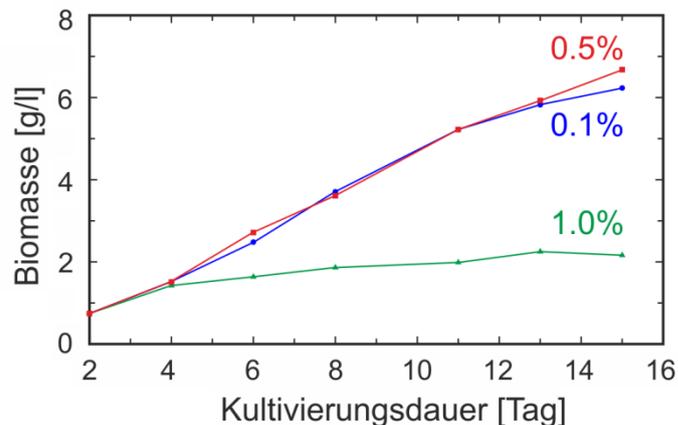


Abb. 54: Zeitliche Dynamik des Biomassezuwachses der Mikroalge vom Typ *M. neglectum* für verschiedene Salzkonzentrationen: 0.1% (blau), 0.5% (rot) und 1.0% (grün). Für den Salzgehalt von 0.1% und 0.5% lässt sich eine kontinuierliche Zunahme der Biomasse beobachten, während sie bei einer Salzkonzentration von 1% bereits nach wenigen Tagen in Sättigung geht (adaptiert aus [178]).

Bei steigendem Salzgehalt verändern sich neben der Biomasseproduktivität auch die Form und die Größe der Algen (s. Abb. 55): Aus länglichen 10 μm großen Zellen bilden sich runde Zellcluster mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 25 μm [178].

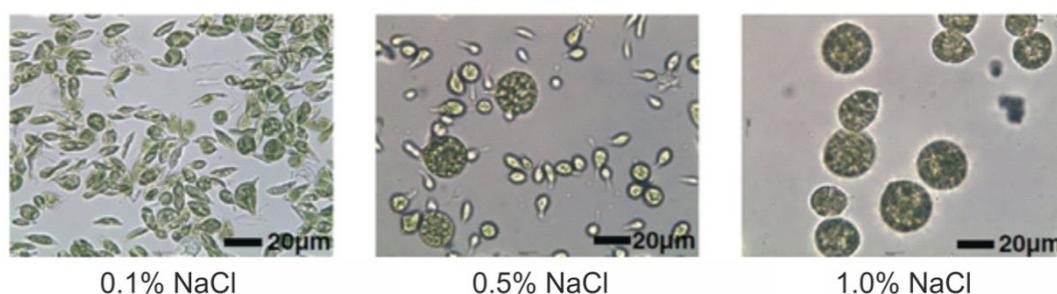


Abb. 55: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Algenkultur mit verschiedenen Konzentrationen von NaCl: 0.1%, 0.5% und 1% (von links nach rechts). Der steigende Salzgehalt bewirkt eine Form- und Größenänderung der Zellen. Bei einer NaCl-Konzentration von 0.1% haben die einzelnen Algen eine längliche Form und eine durchschnittliche Länge von 10 μm , bei einer Salzkonzentration von 0.5% bilden sich bereits erste Zellcluster, die eine runde Form und einen Durchmesser von 25 μm besitzen. Bei einem Salzgehalt von 1% liegen nur noch größere Algenaggregate in der Kultur vor (adaptiert aus [178]).

Erste Lipidomik-Messungen an *M. neglectum* wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Olaf Kruse durchgeführt. Um sicherzustellen, dass sich dieser Algenstrang als potentielle Quelle zur Biokraftstoffproduktion eignet, wurden die chemische Zusammensetzung der Lipide und deren Ausbeute in regelmäßigen Zeitabständen in Abhängigkeit von externen Kultivierungsbedingungen bestimmt. Dazu wurde eine große Anzahl von Algenzellen zerstört, um die Lipide freizusetzen. Diese wurden anschließend nach Anreicherungsverfahren und Separation von anderen Zellbestandteilen mit unterschiedlichen Methoden analysiert.

Zu den verbreitetsten Verfahren in der Lipidomik zählen die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), die im Folgenden vorgestellt werden.

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie ist ein bewährtes automatisiertes Verfahren für das Zählen und Vermessen von Partikeln bzw. Zellen in Suspension (s. Abb. 56). Dabei können unterschiedliche Parameter von Zellen, wie deren Viabilität, Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies oder Lipidanteil, bestimmt werden [194]. Zur Bestimmung des Lipidgehalts in den Algen werden diese vor den eigentlichen Messungen mit einem Fluorochrom angefärbt, der eine Affinität zu TAGs aufweist. Zu den typischen Neutrallipid-spezifischen Farbstoffen gehören Nile Red oder BODIPY 505/515 [195]. Daraufhin wird der Probenstrom aus den fluoreszenzmarkierten Zellen via Überdruck in den umgebenen Hüllstrom (z. B. phosphatgepufferte Salzlösung) injiziert. Letzterer sorgt über eine hydrodynamische Fokussierung für die mittige Führung des Probenstroms innerhalb der Messküvette und anschließende Trennung der Algen, damit sie einzeln analysiert werden können.

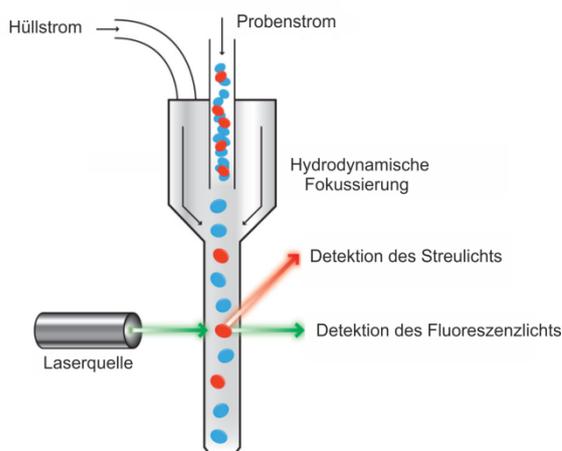


Abb. 56: Graphische Darstellung der Funktionsweise der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Die Probenflüssigkeit wird in den umgebenen Hüllstrom höherer Geschwindigkeit geleitet, um die Probenflüssigkeit in der Messküvette zu zentrieren und die Zellen zu separieren. Dadurch wird eine Zelle nach der anderen durch den Laserfokus geführt, in dem das Fluoreszenz- (grüner Strahl) und Streulicht (roter Strahl) detektiert werden (adaptiert aus [196]).

In der eigentlichen Durchflusszelle passieren die Algen eine nach der anderen den Laserstrahl. Dabei wird sowohl das Streulicht als auch (bei geeigneter Anregungswellenlänge) das Fluoreszenzlicht von empfindlichen Detektoren (z. B. Photomultipliern) erfasst. Das Streulicht kann in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung (unter

einem Winkel von 90° zum Laserstrahl) detektiert werden (s. Abb. 56, roter Strahl). Die Intensität des Streulichts, das entlang der Achse der einfallenden Laserstrahlung registriert wird, lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße zu, während das Seitwärtsstreulicht Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen und deren Bestandteile liefert. Die detektierte Fluoreszenzintensität (s. Abb. 56, grüner Strahl) ist proportional zum Lipidgehalt [194], [197].

Zu den Vorteilen des durchflusszytometrischen Verfahrens gehören dessen Automatisierung und vor allem die hohe Messgeschwindigkeit. Mit Hilfe dieser Fluoreszenz-basierten Methode lassen sich mit modernen leistungsfähigen Zytometrie-Systemen über 100,000 Zellen pro Sekunde analysieren [198]. Darüber hinaus kann die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sowohl selbstständig als auch in Kombination mit einer Zellsortierung eingesetzt werden [199].

Allerdings stellt das Anfärben der Algen ein Problem dar: Zum einen müssen die Zellen vorbehandelt werden, um die Permeabilität der Zellmembran für die Farbstoffe zu erhöhen, und zum anderen werden die Fluorochrome oft ungleichmäßig von den Algen aufgenommen [195], [200]. Dies führt dazu, dass das Anfärben der zu untersuchenden Fettsäuren nur unvollständig und sehr stark abhängig von Parametern, wie Größe und Zusammensetzung von LD erfolgt. Des Weiteren muss die Autofluoreszenz der Zellbestandteile, vor allem der endogenen Farbstoffe, als störendes Hintergrundrauschen berücksichtigt werden. Beispielsweise liegt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Nile Red (in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel) bei 552 nm und das Emissionsmaximum bei 636 nm [201]. Die Absorptionsmaxima des in den Algen stark vertretenen Chlorophylls liegen bei 440 nm und 660 nm (Emissionsmaximum bei ca. 680 nm) [202]. Die Anregung von BODIPY 505/515 (Absorptionsmaximum bei 505 nm, Emissionsmaximum bei 515 nm) [203] regt gleichzeitig die Eigenfluoreszenz der Carotinoide an (Absorptionsmaximum je nach Anzahl der Doppelbindungen: 400-520 nm, Emissionsmaximum: 540-550 nm) [204]. Zu beachten ist auch der phototoxische Effekt der fluoreszierenden Markierung: Die bereits analysierten angefärbten Zellen können für weitere *in vivo* Untersuchungen nicht mehr verwendet werden. Zur Optimierung der Kultivierungsparameter muss aber auch die zellinterne Entwicklungsdynamik der einzelnen Mikroalgen (z. B. Wachstum, Lipidanreicherung) zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden.

Somit ist die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie zwar eine schnelle Hochdurchsatztechnik für die Einzelzellanalyse, liefert jedoch nur bedingt aussagekräftige Daten zur Bestimmung des Lipidgehalts in Zellen und lässt keine *in vivo* Kontrolle des Lipidakkumulationsprozesses zu.

HPLC ist ein etabliertes Verfahren sowohl zur Auftrennung eines Substanzgemisches als auch zur Aufreinigung und Identifizierung einzelner Komponenten im Gemisch. Hierbei wird der Analyt in der mobilen Phase gelöst und anschließend durch eine dicht gepackte stationäre Phase, die sich in einer Trennsäule befindet, mit hohem Druck (300-400 bar)

gepumpt. In der Säule kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase (z. B. Kieselgel), die zur unterschiedlichen Verweildauer einzelner Komponenten in der Trennsäule führen [200]. Kleinere Moleküle werden stärker retardiert und haben dementsprechend eine höhere Aufenthaltsdauer in der Trennsäule, weil sie im Vergleich mit größeren Molekülen tiefer in die Poren der stationären Phase eindringen. Diese sogenannten Retentionszeiten werden in der Regel durch Messungen der Absorption der einzelnen Komponenten bei bestimmten Wellenlängen am Säulenausgang von UV-Vis-spektrometrischen Detektoren erfasst. Die Retentionszeit hängt von der Trennsäulenlänge und der Wanderungsgeschwindigkeit einer Komponente ab und ist charakteristisch für eine bestimmte Substanz.

Normalerweise wird das Endergebnis in Form eines Chromatogramms dargestellt, in dem die Extinktion über die Retentionszeit bei einer bestimmten Wellenlänge aufgetragen ist. Jeder Peak im Chromatogramm entspricht einer spezifischen Substanz. Die Bandenzuordnung erfolgt überwiegend über den Abgleich mit Datenbanken. Von Bedeutung ist auch die Peakfläche, die proportional zur Konzentration ist. Die Substanzmenge kann infolgedessen nach entsprechender Kalibrierung quantifiziert werden.

Mit dieser Methode wird eine Nachweisgrenze bis zu wenigen ng/ml erreicht [205]. Dies ermöglicht die präzise Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der LD in den Algen. Darüber hinaus lassen sich bei der HPLC-Analyse über 100 Komponenten simultan trennen. Die Messzeit hängt dabei vor allem von der jeweiligen Probe und Länge der Trennsäule ab [200]. HPLC lässt zwar die genaue Identifizierung der einzelnen Bestandteile der LD zu, wobei die Lipide vor der Untersuchung in einem zeitaufwendigen Prozess aus den Algen extrahiert werden müssen. Dabei geht allerdings die Individualität der einzelnen Algen (die Struktur der einzelnen LD, deren Größe, Anzahl und deren Verteilung innerhalb der Zellen) verloren, d. h. man analysiert die Komposition eines aus mehreren Algen gewonnenen Lipidgemischs. Herms et. al haben bereits gezeigt, dass die Komposition von LD von Zelle zu Zelle auch innerhalb einer Kultur variieren kann [206]. Somit ist neben HPLC eine weitere Zell-Charakterisierung notwendig, um die Zusammensetzung der Lipide in einzelnen Zellen zu bestimmen.

Mit den beiden vorgestellten Methoden lassen sich die Lipide in Algen zwar mit unterschiedlicher Empfindlichkeit charakterisieren, aber jedes Verfahren ist destruktiv auf seine Art und Weise. HPLC gibt des Weiteren lediglich einen Durchschnittswert für die untersuchte Algenkultur an.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Anwendung der spontanen Raman-Spektroskopie zur Analyse von lipidhaltigen Algen am Beispiel von *Monoraphidium neglectum* überprüft werden. Im Unterschied zu den oben genannten Methoden zur Strukturaufklärung erlaubt die Raman-Spektroskopie zwar keine hohen „Durchsatzraten“, benötigt aber dafür keine spezielle Präparation oder Marker. Sie lässt sich auch an einzelnen Zellen in ihrer nativen Umgebung durchführen. Darüber hinaus ist sie zerstörungsfrei und kann daher wiederholt

an einzelnen Zellen zu verschiedenen Zeiten durchgeführt werden, um die zeitliche Entwicklung der Lipid-Synthese zu verfolgen.

4.2.3 Probenpräparation

Die hier untersuchten Algen wurden von Daniel Jäger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Olaf Kruse präpariert. Die mixotrophen und axenischen *M.neglectum*-Vorkulturen wurden in einem speziellen Medium mit einem pH-Wert von 7.7 und der folgenden Zusammensetzung inkubiert [207]:

Mediumsbestandteile	Konzentration [μM]
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2720
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.050
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.018
EDTA	103
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	12.2
H_3BO_3	160
KCl	21460
K_2HPO_4	570
NaCl	17100
MgSO_4	4870
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	16.7
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	12.5
NaNO_3	11770
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
TRIS	8260
ZnCl_2	2.2

Tab. 9: Chemische Zusammensetzung des verwendeten Kultivierungsmediums.

Während der Inkubation wurden die Kulturen gleichzeitig zwei externen Einflüssen ausgesetzt:

- Stickstofflimitierung: 2,5 l ProF -N Medium. Dies führte zur Einstellung des Wachstumsprozesses und zum Ausbleiben der Zellteilung.
- Lichteinstrahlung: $OD_{750} \approx 0.24$ bei 300-400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ kontinuierlichem Lichteinfall ($66-88 \text{ W}/\text{m}^2$)⁷. Als optische Dichte (OD) bezeichnet man den dekadischen Logarithmus aus dem Verhältnis zwischen der eingestrahnten und transmittierten Lichtintensität. Die OD wird mittels eines UV-Vis-Spektrometers (Lambda 25, Elmer Perkins) gemessen. Der Index 750 zeigt an, dass die optische Dichte bei der Anregungswellenlänge von 750 nm bestimmt wurde. Da das Licht dieser Wellenlänge von den Mikroalgen nur geringfügig absorbiert wird, kann dessen Abschwächung durch die Streuung an den zu untersuchenden Algenzellen als Maß für die Zelldichte benutzt werden [208]. Üblicherweise liegen die OD_{750} -Werte unter 0.5, da sonst der Zusammenhang zwischen der Konzentration der Zellen und deren optischen Dichte nicht mehr linear ist.

Daraufhin wurden die Kulturen unter 3% CO₂-Begasung und leichtem Rühren 8 Tage lang inkubiert, wobei eine bestimmte Menge der Algen-Suspension täglich entnommen wurde. Insgesamt wurden drei biologische Replikate pro Tag kultiviert.

Um den erwünschten Biomassezuwachs im Laufe der Kultivierungsdauer unter Stickstoffmangel und permanentem Lichteinfluss zu belegen, wurden die Zelldichte und die Trockenmasse an Tag 0, 1, 2, 4 und 8 bestimmt (s. Abb. 57). Zu Beginn der Algenzucht steigt die Zelldichte von $3.9 \cdot 10^6$ Zellen/ml auf $10.7 \cdot 10^6$ Zellen/ml an Tag 4 an, im späteren Kultivierungsverlauf (von Tag 4 zu Tag 8) kommt es nur noch zu vernachlässigbaren Änderungen der Zelldichte (. Abb. 57, blaue Punkte). Die Trockenmasse (energetisch nutzbare Biomasse) hingegen nimmt kontinuierlich bis zu Tag 8 von 0.8 g/l auf 13.6 g/l zu (s. Abb. 56, rote Punkte). Dies ist ein Nachweis für die erwünschte Akkumulation der Speicherstoffe in den Algen.

⁷ Zum Vergleich: An einem sonnigen Tag kann die Bestrahlungsstärke der Sonne (einfallende Energiemenge pro Fläche und Zeit) bis zu $2000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ betragen. Dies entspricht $438 \text{ W}/\text{m}^2$ für den für die Photosynthese relevanten Spektralbereich (400-700 nm).

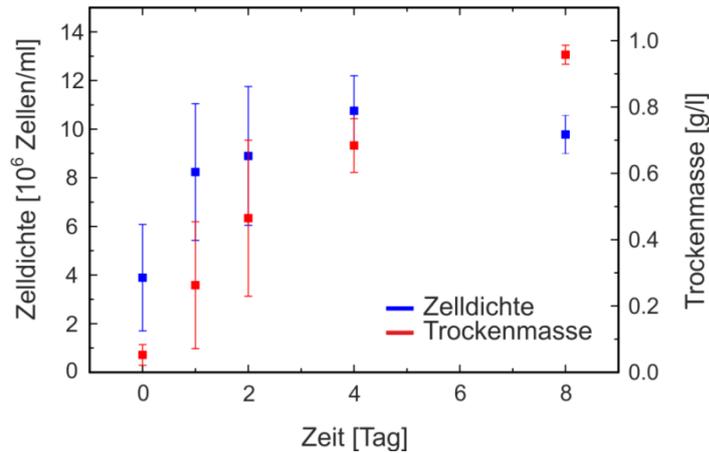


Abb. 57: Zeitliche Entwicklung der durch die Kultivierungsbedingungen beeinflussbaren Zellparameter (hier: Stickstofflimitierung und Lichteinstrahlung): Zelldichte (blau) und Trockenmasse (rot). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von drei Messungen mit dem zugehörigen Konfidenzintervall von 90% dar. Ab Tag 4 stellt sich eine nahezu konstante Zelldichte ein, während sich ein weiterer Anstieg der Trockenmasse beobachten lässt. Die Daten wurden von Daniel Jäger zur Verfügung gestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Algen mit unterschiedlicher Einwirkzeit der Wachstumsfaktoren mittels der spontanen Raman-Spektroskopie untersucht (3 Tage, 4 Tage und 8 Tage). An jedem der aufeinanderfolgenden 8 Tage wurde eine bestimmte Menge der Algen-Suspension entnommen und für weitere Analysen auf Eis gelagert. Für die Raman-Spektroskopie wurden die Zellen mit der phosphatgepufferten Salzlösung (engl. *Phosphate Buffered Saline, PBS*) für 10-15 Minuten gewaschen und anschließend mit 1 ml Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in PBS) für 10-15 Minuten fixiert. Für die Probenanalyse mittels der spontanen Raman-Spektroskopie ist prinzipiell keine Zellfixierung notwendig. Die Tatsache, dass die Messungen nicht *in situ* durchgeführt werden konnten und die Algen erst zum Raman-System transportiert werden mussten, machte eine Fixierung erforderlich. Auf die Paraformaldehyd-Behandlung der Zellen folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Die entnommenen Algen wurden bis zur Analyse im Dunkeln bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor den Raman-Messungen wurden 20 µl der hergestellten *Monoraphidium neglectum*-Suspension auf ein Quarz-Substrat aufgetragen und anschließend in wässriger Umgebung untersucht.

4.2.4 Probencharakterisierung

Vor den eigentlichen Raman-Messungen wurden die Algen in Bezug auf ihre Integrität und Lipid-Akkumulation mit Hilfe von optischen und chromatographischen Methoden charakterisiert.

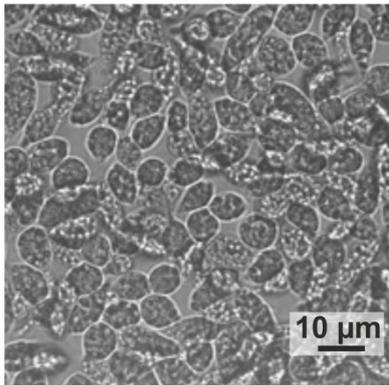


Abb. 58: Exemplarisches Durchlichtbild einer untersuchten Algenprobe in wässriger Lösung auf einem Quarz-Substrat. Die Zellen wurden 4 Tage lang unter Stickstoffmangel und intensiver Lichteinstrahlung kultiviert. Die hellen Punkte innerhalb der einzelnen Algen sind Ansammlungen von Lipid-Tröpfchen. Die Aufnahme erfolgte mit einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2).

Die konventionelle Lichtmikroskopie ist eine schnelle und einfache Möglichkeit, die Dichte und die Reinheit der Algen-Suspension, sowie die Integrität einzelner Zellen sowohl in der Kultur als auch auf dem Substrat zu kontrollieren. Die untersuchte Algen-Suspension weist eine hohe Zelldichte auf und im Lichtmikroskop lassen sich keine sichtbaren Kontaminationen und keine apoptotischen Zellen beobachten (s. Abb. 58). Die visuelle Kontrolle bestätigt auch die morphologische Integrität der einzelnen Algen.

Durch chromatographische Messungen wurden die Abhängigkeit der energetisch verwertbaren Trockenmasse und deren biochemischen Zusammensetzung von den Umgebungsbedingungen (Zelldichte, Bestrahlung und Stickstoffmenge) untersucht. Es lagen Kulturen mit unterschiedlichen Verdünnungen vor. Die Kulturen mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$ Zellen/ml wurden als „niedrig“, die mit einer Zelldichte von $6 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$ Zellen/ml als „hoch“ bezeichnet (s. Abb. 59, *-N, niedrig und -N, hoch*). Beide Proben wurden 5 Tage unter gleichen Bedingungen in einem stickstoffarmen Medium unter Lichteinstrahlung (Belichtungsstärke: 77 W/m^2) kultiviert. Als Vergleich wurde eine Kultur mit geringer Zelldichte ohne Stickstofflimitierung (s. Abb. 59, *+N, niedrig*) untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse deren Trockenmassezuwachses in Bezug auf polare und neutrale Lipide. Dafür wurden die Gesamtlipide nach dem Folch-Protokoll aus den Algen extrahiert [209] und daraufhin mittels HPLC (vgl. Kap. 4.2.4) in polare und neutrale Lipide separiert. Die wichtigsten Vertreter der polaren Lipide sind Phospholipide. Zu neutralen Lipiden gehören vor allem TAGs, die für die Biokraftstoffproduktion von Interesse sind.

Der Vergleich der Proben *-N, niedrig* (geringe Zelldichte) und *-N, hoch* (hohe Zelldichte) bei geringer Stickstoffkonzentration zeigt, dass eine höhere Ausbeute an neutralen Lipiden in der Kultur *-N, niedrig* erreicht werden konnte (s. Abb. 59, dunkelgraue Balken). Diese Beobachtung lässt sich auf die vergleichsweise homogene Beleuchtung einzelner Zellen in einer dünneren Probe zurückführen. Die Algen erhalten ausreichend Licht, wodurch die Photosynthese-Leistung hoch ist und damit auch die Biomasse-Produktion zunimmt [171]. Infolge der vermehrten Stapelung der Algen in der dichteren Kultur und der einhergehenden Abschattung der unteren durch die oberen Algen-

Schichten kommt es zur ungleichmäßigen Beleuchtung einzelner Zellen innerhalb der untersuchten Probe.

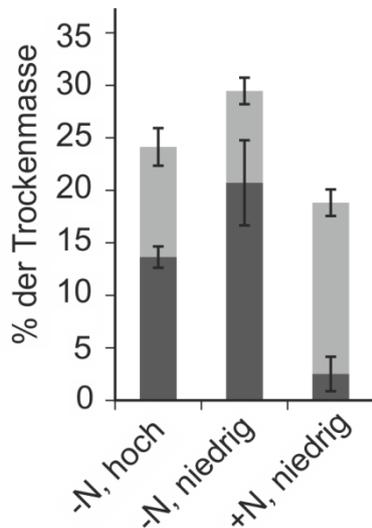


Abb. 59: Chromatographische Bestimmung des Biomassezuwachses von *Monoraphidium neglectum* in Abhängigkeit von der verfügbaren Licht- und Stickstoffmenge. *-N, hoch* und *-N, niedrig* stehen für die Biomassezunahme im stickstoffarmen Medium für hohe ($6 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml) und niedrige ($2 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml) Algendichten. *+N, niedrig* repräsentiert den Zuwachs an Biomasse für die Algenkultur mit geringer Dichte ($2 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml) im stickstoffreichen Medium. Hellgraue Balken stellen polare Lipide dar und dunkelgraue Balken neutrale Lipide. Das Diagramm wurde nach 5 Tagen Inkubation erstellt. Die eingezeichneten Fehlerbalken repräsentieren die anhand von 4 Stichproben berechnete Standardabweichung (adaptiert aus [178]).

Basierend auf den aufgenommenen Daten kann geschlussfolgert werden, dass auch die Stickstofflimitierung in hohem Maße zur Erhöhung der Trockenmasse der neutralen Lipide (s. Abb. 59, dunkelgraue Balken, *-N, hoch* und *-N, niedrig*) beiträgt. Vergleicht man die Lipidkomposition der Algenkultur mit geringer Zelldichte in einem stickstoffreichen und in einem stickstoffarmen Medium (s. Abb. 59, *+N, niedrig* und *-N, niedrig*), so ergibt sich ein Trockenmassezuwachs an neutralen Lipiden unter Stickstoffmangel von $20.9 \pm 4.0\%$, während dieser für Zellen in einem stickstoffreichen Medium lediglich $2.5 \pm 1.6\%$ beträgt (s. Tab. 10).

Medium	Gesamtlipidgehalt [% i.d.Tr.]	Neutrallipidgehalt [% i.d.Tr.]
stickstoffarm	30.4 ± 3.4	20.9 ± 4.0
stickstoffreich	21.7 ± 1.7	2.5 ± 1.6

Tab. 10: Zusammenstellung der Lipidproduktion in *M. neglectum* in Bezug auf den Gehalt von gesamten und neutralen Lipiden angegeben in Prozent der Trockenmasse, wobei sich der Gesamtlipidgehalt aus dem polaren und neutralen Lipidanteil zusammensetzt. Die Standardabweichung wurde anhand von 4 Stichproben in einer Kultur mit geringer Dichte ($2 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) in einem stickstoffarmen Medium bestimmt (s. Abb. 59, *-N, niedrig*) (adaptiert aus [178]).

Aus den in der Tabelle 10 gezeigten Daten wird ersichtlich, dass der Gesamtlipidgehalt in einem stickstoffarmen Medium mit $30.4 \pm 3.4\%$ i. d. Tr. im Vergleich zu dem im stickstoffreichen Medium mit $21.4 \pm 1.7\%$ i. d. Tr. erhöht ist [178]. Bis auf die

unterschiedliche Stickstoffkonzentration sind die Kultivierungsbedingungen für beide Proben gleich. Bei neutralen Lipiden (z. B. TAGs) dagegen erkennt man eine noch deutlichere Lipidanreicherung in einem stickstoffarmen Medium unter intensiver Bestrahlung: Der Neutrallipidgehalt steigt von $2.5 \pm 1.6\%$ auf $20.9 \pm 4.0\%$. Diese Erhöhung konnte durch eine Optimierung der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Probenpräparation erreicht werden. Damit wurde gezeigt, dass eine erhöhte Lipidproduktivität bei der zu untersuchenden Algenart initiiert werden kann, indem die Kultivierungsbedingungen gezielt eingestellt werden.

Im Weiteren wird die Zusammensetzung der Lipide genauer analysiert, denn nur gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren kommen wegen der Stabilität des daraus synthetisierten Öls für eine Weiterverarbeitung in Frage (vgl. Kap. 4.2.2). Die Identifizierung der einzelnen Fettsäuren im Lipid-Gemisch erfolgte mit der Massenspektrometrie. Als Referenz diente dabei ein 37 FAME Mix (47885-U, Supelco) aus 37 bekannten Fettsäuremethylestern (engl. *Fatty Acid Methyl Ester, FAME*) [178]. Die in den Algen enthaltenen Lipide mussten deshalb vor den massenspektrometrischen Messungen durch Umesterung mit Methanol in ihre korrespondierenden Methylester überführt werden. Das bedeutet, dass die TAGs bei diesem Präparationsschritt in ihre Bestandteile (Glycerin und Methylester) aufgespalten wurden, wobei nur die Methylester für die darauffolgende Analyse verwendet wurden.

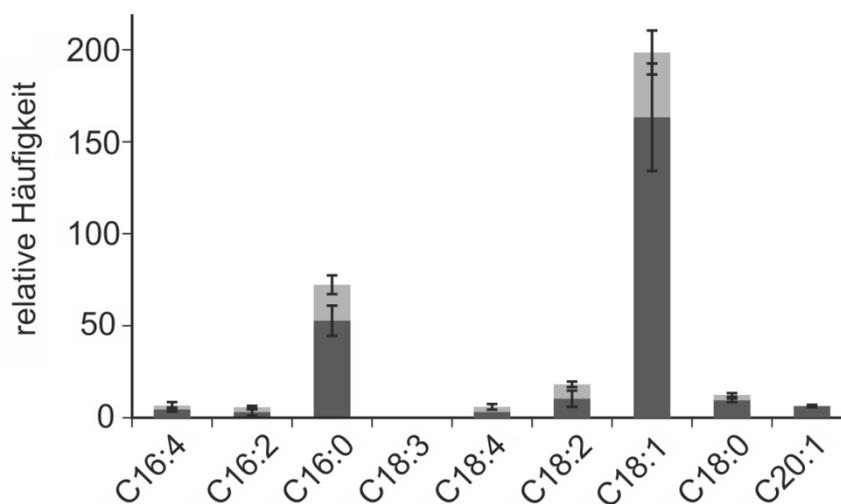


Abb. 60: Exemplarische Verteilung einzelner Fettsäuren in den Algenzellen für $-N$, *niedrig*, bestimmt mit Hilfe eines Standard-C17-FA-Sets. Der polare Lipidgehalt wird in hellgrau und der neutrale Lipidgehalt in dunkelgrau dargestellt. Die eingezeichneten Fehlerbalken repräsentieren die anhand von 4 Stichproben berechnete Standardabweichung (adaptiert aus [178]).

Zur Bestimmung der relativen Verhältnisse der in der Probe vorhandenen Fettsäuren wurde das Lipid-Gemisch nach der Zugabe von $50 \mu\text{g}$ C17-Triacylglycerid („innerer Standard“) chromatographisch aufgetrennt (s. Abb. 60) [178]. C17 ist eine gereinigte

langkettige Fettsäure, deren Alkan-Kette aus 17 Kohlenstoffatomen besteht. Sie kommt in den zu analysierenden Lipiden nicht vor, deshalb dient C17 als Normierungsfaktor für den Gehalt der im Lipid-Gemisch vorhandenen Fettsäuren.

Die Auswertung der chromatographischen Daten (s. Abb. 60) zeigt eine klare Dominanz von C16:0 und C18:1 in der vorliegenden Zellkultur: Ca. 22-24% der gesamten Fettsäuren lassen sich als C16:0 (Palmitinsäure) und ca. 61% als C18:1 (Oleinsäure) identifizieren, die in hohem Maße zu Speicherlipiden (TAGs) beitragen (vgl. Kap. 4.2.2) und somit interessant für die Biotechnologie sind [178].

Anhand der chromatographischen Messungen lässt sich sagen, dass in den LD von *M. neglectum* hauptsächlich C16:0 und C18:1 vorkommen. Daraus lässt sich folgern, dass daraus synthetisiertes Öl stabil ist und gut weiterverarbeitet werden könnte. Die bisher durchgeführte Auswertung beruht jedoch auf der Analyse eines Lipid-Gemisches, das nicht unbedingt das Akkumulationsverhalten und die biochemische Zusammensetzung einzelner Algen widerspiegelt. Zur weiteren Optimierung der Kultivierungsbedingungen müssen demzufolge auch einzelne Algenzellen stichprobenartig untersucht werden. Dies wird durch den Einsatz der spontanen Raman-Spektroskopie ermöglicht.

4.2.5 Spontane Raman-Spektroskopie an einzelnen Mikroalgen

Im Folgenden werden Raman-Messungen an einzelnen Algen durchgeführt. Es erfolgt eine Analyse der chemischen Zusammensetzung der Alge *M. neglectum* mittels der spontanen Raman-Spektroskopie an LD in verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkdauer der wachstumsstimulierenden Faktoren. Dazu wurden die Zellen in wässriger Lösung auf einem Quarz-Substrat als Unterlage direkt auf dem Mikroskop präpariert. Nach ca. 1-2 Minuten hat sich der Großteil der Zellen auf dem Substrat abgesetzt und einzelne Zellen konnten direkt mit dem Laserstrahl des Raman-Spektrometers adressiert werden (s. Abb. 61).

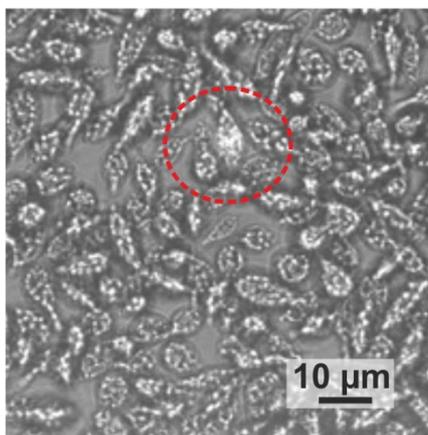


Abb. 61: Durchlichtaufnahme einer Algenprobe *M. neglectum* auf einem Quarz-Substrat. Die Zellen wurden der Stickstofflimitierung und intensiver Bestrahlung 4 Tage lang ausgesetzt. Der Laserfokus ($\lambda = 785 \text{ nm}$) zur Raman-Messung ist rot umrandet. Die Aufnahme erfolgte mit einem 60x Wasserimmersionsobjektiv (NA 1.2). Helle Punkte innerhalb der Zellen sind die akkumulierten Lipide.

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Photosynthese enthalten die Algen lichtempfindliche Pigmente, deren Aufgabe in der Absorption von Licht und seiner Umwandlung in chemische Energie besteht. Die wichtigsten Pigmenthauptgruppen sind dabei Chlorophyll und Carotinoide. Die Absorptions- und Emissionsmaxima dieser Stoffe liegen im Vis-Bereich zwischen 400 nm und 700 nm (vgl. Kap. 4.2.3). Dementsprechend eignen sich für die Untersuchung von Mikroalgen mittels der spontanen Raman-Spektroskopie Anregungswellenlängen im NIR-Bereich. Infolgedessen wurde zur Anregung die Laserdiode mit einer Emissionswellenlänge von 785 nm verwendet. Diese Wellenlänge ermöglicht ebenfalls eine größere Eindringtiefe (vgl. Kap. 2.2.3), welche für die Analyse von dreidimensionalen LD von Vorteil ist.

Da die Anzahl und die Größe von LD in den Algen von der Einwirkdauer der Wachstumsfaktoren abhängen, wurden im ersten Schritt Raman-Spektren der Zellkultur in drei verschiedenen Lipidanreicherungsstadien (3 Tage, 4 Tage und 8 Tage unter Stickstofflimitierung und Lichteinstrahlung nach Beginn des Experiments) miteinander verglichen (s. Abb. 62).

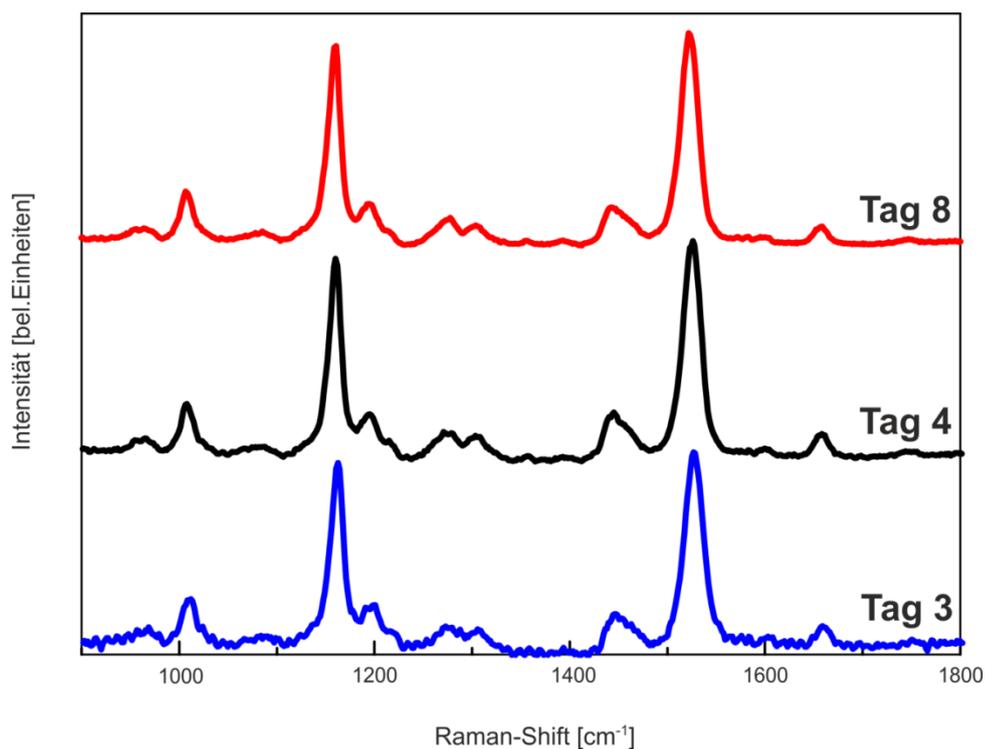


Abb. 62: Vergleich der Raman-Spektren von *Monoraphidium neglectum* nach 3 Tagen (blau), 4 Tagen (schwarz) und 8 Tagen (rot) unter Stickstoffmangel und Lichtbestrahlung nach Beginn des Experiments. Aufgenommen wurden die Spektren auf Quarz-Substraten mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW, einem 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3) und einer Belichtungszeit von 20 s, wobei jedes der hier präsentierten Spektren jeweils eine Akkumulation über 3 einzelne auf der gleichen Stelle aufgenommenen Spektren darstellt. Zur Übersichtlichkeit wurden die Spektren in der Intensität verschoben (adaptiert aus [210]).

Der Vergleich der drei Spektren zeigt keine signifikanten Unterschiede. Folglich ändert sich die Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile der Mikroorganismen innerhalb eines Zeitraums von bis zu 8 Tagen nicht wesentlich. Allerdings lässt sich eine deutliche Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der aufgenommenen Spektren mit zunehmender Kultivierungsdauer unter den oben genannten Bedingungen beobachten. Dies ist auf die steigende Anzahl und Größe der LD und somit auf eine Erhöhung der Konzentration des Materials im fokalen Volumen zurückzuführen, die proportional zur Raman-Signalintensität ist.

Die einzelnen Raman-Peaks treten in allen drei gezeigten Spektren der Mikroalgen auf. Diese Signaturen wurden anhand eines exemplarischen Spektrums identifiziert. Das ist in Abbildung 63 für die Probe von Tag 8 dargestellt.

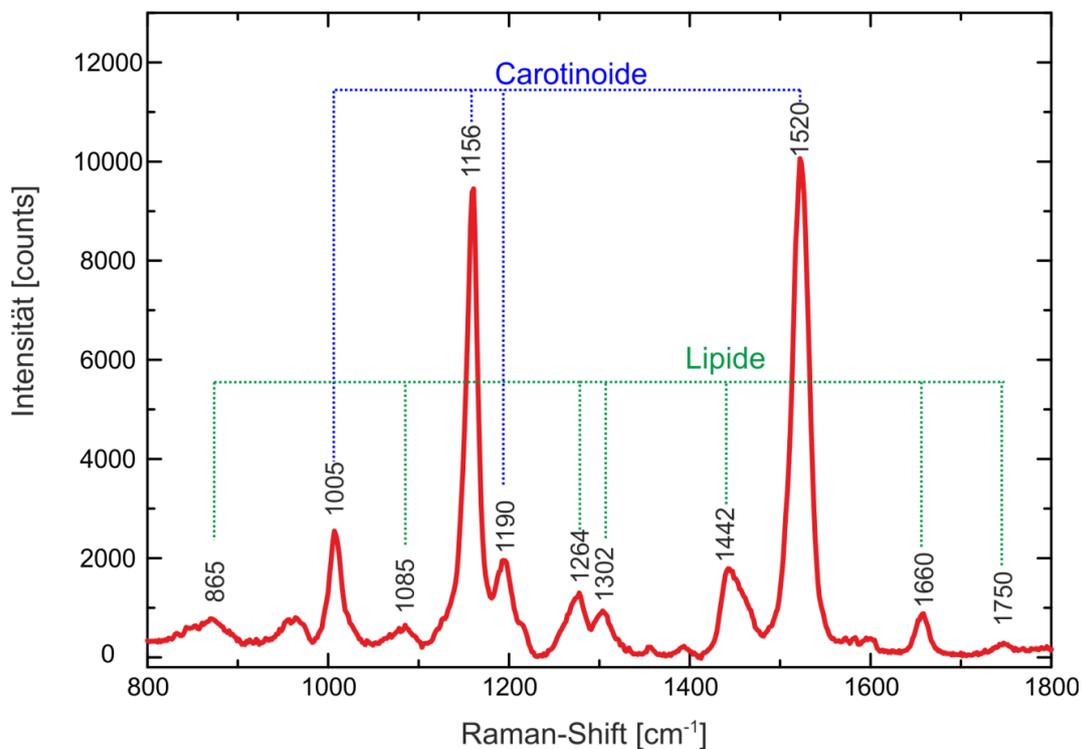


Abb. 63: Exemplarisches Raman-Spektrum von *M. neglectum* nach 8 Tagen unter Stickstofflimitierung und intensiver Lichteinstrahlung. Aufgenommen wurde das Spektrum auf einem Quarz-Substrat mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm, einer fokalen Leistung von 25 mW, einem 100x Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3) und einer Belichtungszeit von 20 s. Das hier gezeigte Spektrum stellt eine Akkumulation über 3 einzelne auf der gleichen Stelle aufgenommenen Spektren dar. Mit blau gepunkteten Linien wurden die Raman-Peaks gekennzeichnet, die sich Carotinoiden zuordnen lassen. Die grün gepunkteten Linien markieren die Lipid-Resonanzen. Die einzelnen Schwingungen sind in Tabelle 11 zusammengetragen (adaptiert aus [210]).

Die einzelnen Raman-Schwingungen aus der Abbildung 63 sind übersichtshalber in tabellarischer Form nachstehend aufgeführt (s. Tab. 11).

Position [cm^{-1}]	Schwingung	Zuordnung
865	O-C-C-N-Streckschwingung	Phospholipide
1005	C-H-Biegeschwingung	Carotinoide
1085	O-P-O-Streckschwingung	Phospholipide
1156	C-H-Streckschwingung	Carotinoide
1190	C-H-Biegeschwingung	Carotinoide
1264	C-H-Streckschwingung	Alkyle
1302	CH_2 -Drehschwingung	Alkyle
1442	CH_2 -Scherschwingung	Alkyle
1520	C=C-Streckschwingung	Carotinoide
1660	C=C-Streckschwingung	Alkyle
1750	C=O-Streckschwingung	Ester

Tab. 11: Zusammenstellung der in Abbildung 63 auftretenden Raman-Resonanzen und deren Zuordnung [211], [212].

Die Raman-Banden mit den höchsten Spitzenintensitäten bei 1005 cm^{-1} , 1156 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} und 1520 cm^{-1} lassen sich Carotinoiden zuordnen [213]. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen primären und sekundären Carotinoiden. Die ersteren kommen in den Chloroplasten vor und spielen gemeinsam mit dem Chlorophyll eine wichtige Rolle in der Photosynthese bei der Dissipation der überschüssigen Lichtenergie in Form von Wärme und beim Schutz vor oxidativem Stress. Die sekundären Carotinoide befinden sich dagegen außerhalb von Chloroplasten und zeigen einen Trend zur Akkumulation in LD unter Stressbedingungen, wobei die Carotinoide dort aufgrund ihrer hohen Löslichkeit in Fetten mehr oder minder gleichmäßig verteilt in den LD vorliegen [214]–[216].

Am Beispiel von *Dunaliella salina* wurde bereits gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen der Konzentration an Carotinoiden (vor allem β -Carotenen) und der Einwirkung von Licht gibt: Je stärker die Lichteinstrahlung ist, desto mehr Carotinoide, vor allem β -Carotene, werden produziert [217]. Die untersuchten Algen wurden ebenfalls einer Bestrahlung (3 Tage, 4 Tage und 8 Tage) ausgesetzt, um die Lipid-Anreicherung gezielt zu beschleunigen.

Allerdings ist die lichtinduzierte Zunahme an Carotinoiden und deren Akkumulation in LD nicht alleine für die stark ausgeprägte Raman-Signatur verantwortlich. Normalerweise liegt der Anteil der Carotinoide in einer Algenzelle auf der ppm-Skala und resultiert

infolgedessen in einem eher schwachen Raman-Signal [218]. Da aber die Carotinoide aus konjugierten Kohlenstoff-Doppelbindungen (delokalisierten π -Systemen) bestehen [219], lassen sie sich aufgrund des Elektron-Phonon-Kopplungsmechanismus im infraroten Spektralbereich resonant anregen [220]. Das bedeutet, dass die Anregungswellenlänge nahe der Wellenlänge eines elektronischen Überganges des Moleküls liegt. Beim linearen Raman-Effekt wird das betroffene Molekül nach der Wechselwirkung mit dem Photon in einen virtuellen vibronischen Zustand gehoben (vgl. Abb. 3). Beim resonanten Raman-Effekt wird das Molekül hingegen in einen reellen elektronisch angeregten Zustand gehoben. Dies hat einen signifikanten Intensitätsanstieg der resonant angeregten Raman-Bande zur Folge, während andere Peaks, die dagegen durch den linearen Raman-Effekt hervorgerufen werden, eine vergleichsweise geringe Intensität aufweisen. Die LD-Cluster lassen sich bereits mit der konventionellen Lichtmikroskopie beobachten, während die Konzentration der Carotinoide in den Mikroalgen dafür zu gering ist. Das resonante Verhalten schlägt sich in den Spitzenintensitäten der einzelnen Raman-Peaks nieder. Vergleicht man beispielsweise die Intensität der C=C-Streckschwingung der Carotinoide bei 1520 cm^{-1} mit der Intensität der stärksten Lipid-Resonanz der CH_2 -Scherschwingung bei 1442 cm^{-1} , so beträgt das Intensitätsverhältnis $I_{1520/1442} = 5$. Da die Konzentration der Carotinoide jedoch deutlich geringer ist, kann diese Überhöhung nur durch einen resonanten Anregungsprozess dieser Pigmente beschrieben werden.

Neben den Carotinoid-Resonanzen lassen sich insgesamt fünf Lipid-Peaks bei 865 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1264 cm^{-1} , 1302 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} detektieren. Der Peak bei 865 cm^{-1} stammt von der symmetrischen Streckschwingung der Cholin-Gruppe und der Peak bei 1085 cm^{-1} von der symmetrischen Streckschwingung der Phosphat-Gruppe. Die beiden Resonanzen sind ein Hinweis auf die Anwesenheit von Phospholipiden, die sowohl in der Zellmembran der Algen als auch in der Membran der LD vorkommen. Die Raman-Resonanz bei 1750 cm^{-1} ist ein Marker für die gesättigte C=O-Alkylester-Schwingung und somit ein Nachweis für Di- und Triacylglyceride in den LD.

Die verbleibenden Resonanzen bei 1264 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} deuten auf ungesättigte Fettsäuren hin. Die Peaks bei 1302 cm^{-1} und 1442 cm^{-1} lassen sich CH_2 -Schwingungen zuordnen, die sowohl in gesättigten als auch ungesättigten Fettsäuren vorkommen und repräsentieren demnach die Gesamtlipide (neutrale und polare Lipide). Da die Intensität der Peaks bei 1264 cm^{-1} und 1302 cm^{-1} stark von der Struktur und Konformation der Fettsäuren (hier: in den LD) abhängt, wurden zur weiteren Auswertung die Lipid-Resonanzen bei 1442 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} herangezogen. Um den Grad der Unsaturation der analysierten Fettsäuren zu berechnen, wird die Anzahl der nur in den ungesättigten Fettsäuren vorhandenen C=C-Bindungen in Bezug auf die Gesamtfettsäuren bestimmt. Dies erfolgt durch den Vergleich der Spitzenintensitäten der Peaks bei 1442 cm^{-1} (Gesamtfettsäuren) und 1660 cm^{-1} (ungesättigte Fettsäuren) nach dem vorhergehenden Hintergrundabzug: (I_{1660}/I_{1442}) . Die Ergebnisse sind in Abbildung 64a dargestellt. Insgesamt wurden für Tag 4 und Tag 8 drei Replikate mit jeweils 5 Zellen pro Replikat

untersucht. Die Auswertung für Tag 3 wurde aufgrund eines sehr schwachen Signals nur für ein Replikat mit 3 Zellen vorgenommen. Ergänzend wurden die für die Raman-Spektroskopie verwendeten Replikate auch chromatographisch untersucht. Die Messungen wurden von Daniel Jäger an Algen von Tag 4 und Tag 8 durchgeführt und ausgewertet (s. Abb. 64b).

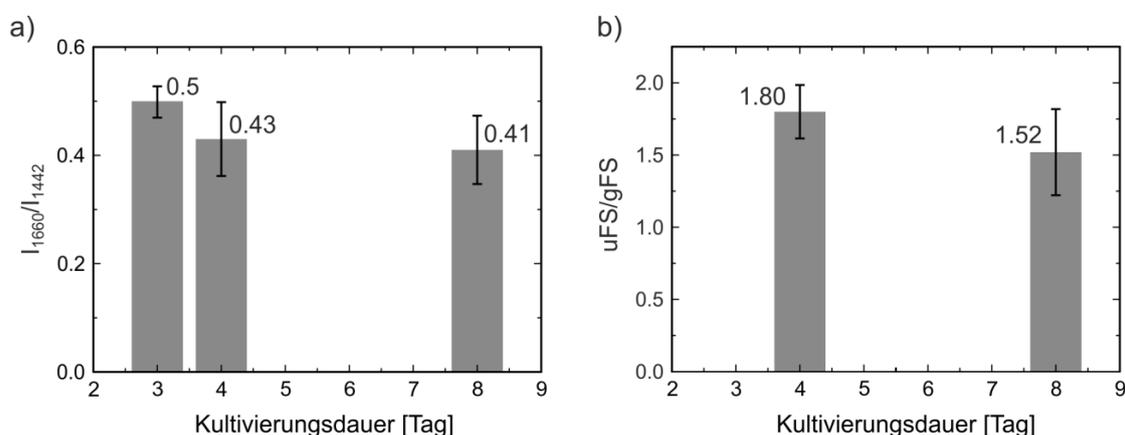


Abb. 64: Graphische Darstellung des Unsaturationsgrades in den Mikroalgen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer unter Stickstoffmangel und Lichteinstrahlung. Der Unsaturationsgrad wurde anhand der Raman-Daten (a) und der chromatographischen Daten (b) bestimmt, wobei die chromatographische Auswertung nur für Tag 4 und Tag 8 (mit jeweils 15 Zellen pro Tag) durchgeführt wurde. Bei der Raman-Auswertung wurde noch Tag 3 mit 3 Zellen berücksichtigt. Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Bezeichnung uFS steht für ungesättigte Fettsäuren und gFS für Gesamtfettsäuren. Das Histogramm in a) basiert auf dem Verhältnis der Peakintensitäten nach dem Hintergrundabzug bei 1660 cm^{-1} und 1442 cm^{-1} , die sich jeweils ungesättigten und gesamten Fettsäuren zuordnen lassen. In b) wurde ebenfalls das Verhältnis der ungesättigten zu gesamten Fettsäuren aufgetragen (adaptiert aus [210]).

Anhand der aufgenommenen Raman-Daten lässt sich eine Abnahme der ungesättigten Fettsäuren von ca. 18% in den zu untersuchenden Zellen von Tag 3 ($I_{1660}/I_{1442} = 0.5$) zu Tag 4 ($I_{1660}/I_{1442} = 0.41$) beobachten (s. Abb. 64a). Unter der Berücksichtigung des Fehlerintervalls sind die beiden Werte allerdings gleich. An dieser Stelle muss aber die geringe Statistik beachtet werden, denn an Tag 3 wurden lediglich 3 Zellen vermessen. Die Verringerung der Anzahl der ungesättigten Fettsäuren geht mit der erwünschten Zunahme der gesättigten Fettsäuren einher, die potentielle Speicherlipide sind. Zwischen Tag 4 ($I_{1660}/I_{1442} = 0.43$) und Tag 8 ($I_{1660}/I_{1442} = 0.41$) kann unter der Berücksichtigung der Standardabweichung kein Unterschied beobachtet werden. Um eine eindeutige Aussage zu treffen, müssen weitere Messungen durchgeführt werden: Es sollten mehrere Zellen pro Tag pro Replikat untersucht werden, auch im Zeitfenster zwischen 5 und 8 Tagen und nach 8 Tagen.

Die auf der Auswertung der chromatographischen Daten basierte Darstellung des Verhältnisses der ungesättigten zu gesamten Fettsäuren in Abhängigkeit von der

Kultivierungsdauer unter Einwirkung der Wachstumsfaktoren zeigt ebenfalls eine Abnahme der ungesättigten Fettsäuren von ca. 16% (s. Abb. 64b). Auch hier ist der Messfehler jedoch so groß, dass die Werte im Rahmen des Fehlers gleich sind.

Vergleicht man die Entwicklung vom Unsatierungsgrad, der sich aus den Raman-Messungen ergibt, mit dem Verhältnis, das sich aus den chromatographischen Messungen ableitet, so zeigen beide Messmethoden das gleiche Verhalten. Infolge der längeren Einwirkdauer von Lichteinstrahlung und Stickstoffmangel lässt sich eine tendenzielle Zunahme von gesättigten Fettsäuren beobachten. Diese Lipide sind primär durch C16:0 vertreten (vgl. Abb. 60) und aufgrund ihrer Energiespeicher-Eigenschaften für die biotechnologischen Anwendungen besonders interessant.

Die an unterschiedlichen Tagen aufgenommenen Raman-Spektren (s. Abb. 62) zeigen zunächst keine signifikanten Unterschiede. Für eine genauere Betrachtung wurde deshalb eine Hauptkomponentenanalyse (vgl. Kap. 3.4.2) durchgeführt, um auch noch geringfügige Unterschiede in den Raman-Spektren zu identifizieren und visualisieren. Konkret muss überprüft werden, ob es Unterschiede zwischen den Raman-Spektren der Algenzellen gibt, die 4 und 8 Tage lang den in Kapitel 4.2.3 beschriebenen wachstumsfördernden Faktoren ausgesetzt waren. In die Auswertung gehen 15 Raman-Spektren pro Tag ein (1 Spektrum pro Zelle, 5 Spektren pro Replikat, insgesamt 3 Replikate). Die Raman-Spektren von Tag 3 mit nur drei untersuchten Zellen werden bei der PCA-Analyse aufgrund der zu geringen Statistik nicht berücksichtigt.

In der Abbildung 65 ist das Ergebnis der PCA-Analyse gezeigt, wobei PC1, PC2, PC3 und PC4 dabei für die einzelnen Hauptkomponenten stehen, die nach absteigender Varianz geordnet sind. Die ersten Hauptkomponenten PC1 und PC2 sind für den wesentlichen Anteil des Gesamtinformationsgehalts des vorliegenden Datensatzes verantwortlich (hier: 93%). Obwohl die Auftragung von PC1 gegen PC2 keine separierten Cluster ergeben hat, wurden um die zusammengehörenden Datenpunkte (Tag 4: schwarz, Tag 8: rot) Ellipsen der entsprechenden Farbe gelegt (s. Abb. 65a). Deren starker Überlapp ist ein Hinweis auf die große interne Streuung zwischen den einzelnen Datenpunkten. Dies kann mit der starken Dominanz der Carotinoid-Resonanzen begründet werden: Aufgrund der resonanten Anregung dieser Pigmente gehen die übrigen Einzelmerkmale (Raman-Peaks) gewissermaßen unter.

In Abbildung 65c) und e) sind die zugehörigen Loading-Plots von PC1 und PC2 dargestellt, wobei die Nullpunktposition durch eine blaue gestrichelte Linie angedeutet ist. Wenn eine Variable in diesem Loading-Plot einen negativen Beitrag aufweist, heißt dies, dass sie in Richtung der betrachteten Hauptkomponente abnimmt (bzw. bei positiven Beiträgen zunimmt). Die Loading-Werte liegen zwischen 0 und 1, wobei 0 auf eine stochastische Unabhängigkeit zwischen der jeweiligen Hauptkomponente und der Variablen und 1 auf eine vollständige Korrelation zwischen den beiden hindeutet.

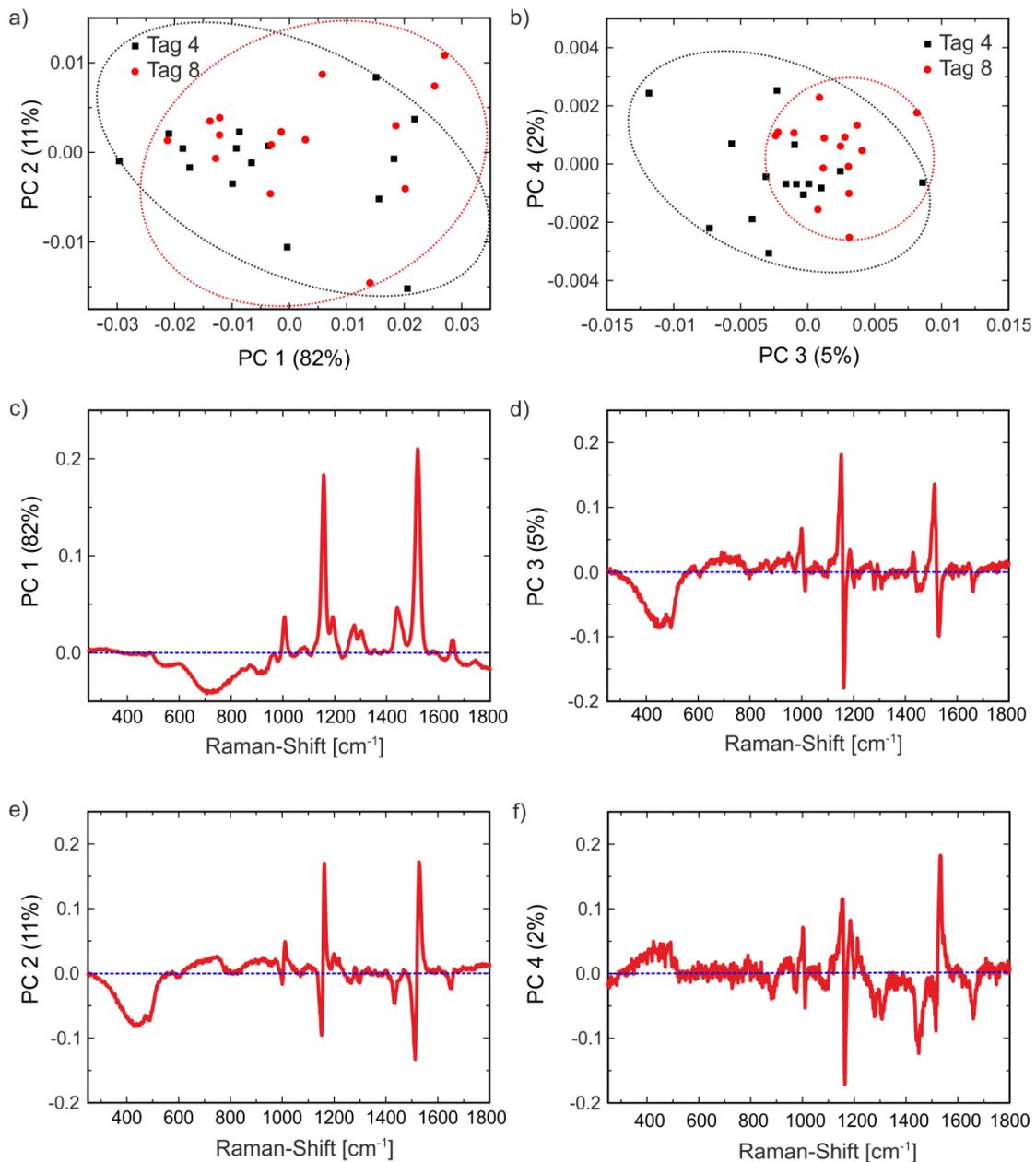


Abb. 65: Hauptkomponentenanalyse der einzelnen Raman-Spektren von Tag 4 und Tag 8, wobei für jeden Tag 15 Raman-Spektren (5 Spektren pro Replikate, insgesamt 3 Replikate) in der Auswertung berücksichtigt wurden. PC1, PC2, PC3 und PC4 stehen dabei für die ausgewählten Hauptkomponenten. In a) ist PC1 gegen PC2 aufgetragen, die gemeinsam 93% des Informationsgehalts enthalten. b) zeigt die Datenpunkte in einem Koordinatensystem, das von PC3 und PC4 aufgespannt ist. Insgesamt tragen die beiden Hauptkomponenten 7% zum Informationsgehalt bei. Sowohl in a) als auch in b) repräsentieren die schwarzen Quadrate die Datenpunkte von Tag 4 und die roten Kreise die Datenpunkte von Tag 8. Zur Veranschaulichung wurden die zusammengehörenden Datenpunkte mit einer roten bzw. schwarzen Ellipse umrandet. In c), d), e) und f) sind die Loading-Plots für PC1, PC3, PC2 und PC4 dargestellt, in denen die jeweilige Hauptkomponente gegen die Raman-Verschiebung aufgetragen ist. In diesen Plots ist die Nullpunktposition durch eine blaue gestrichelte Linie angedeutet.

Im Fall von PC1 besitzen die meisten Variablen positive Loadings (s. Abb. 65c). Aufgrund der positiven Loadings der meisten Raman-Resonanzen auf der ersten

Hauptkomponente und der großen Ähnlichkeit zu den zugehörigen Raman-Spektren lässt sich behaupten, dass PC1 den Mittelwert aller Variablen (hier: Spektren) darstellt. Die zweite Hauptkomponente zeigt die ersten Unterschiede auf, die aus dem Loading-Plot in Abbildung 65e) ersichtlich sind: Es gibt nun positive und negative Loadings. Da die Lipide aber einen kleinen Beitrag zum Gesamtloading liefern, wird auch PC2 hauptsächlich von Schwankungen in Carotinoiden dominiert. Infolgedessen ist auch keine Separation der Datenpunkte in Cluster möglich. Aus diesem Grund werden in b) die nächstgrößten Hauptkomponenten PC3 und PC4 gegeneinander aufgetragen. Zusammen ergeben sie 7% des Gesamtinformationsgehalts und haben dementsprechend ein relativ kleines Gewicht.

Infolge der Reduzierung der internen Streuung zwischen den einzelnen Datenpunkten konnte ihre Separation erzielt werden (s. Abb. 65b). Darüber hinaus lassen sich die dazugehörigen Loading-Plots primär den Carotinoiden (s. Abb. 65d) im Fall von PC3 und den Lipiden (s. Abb. 65f) im Fall von PC4 zuordnen, obwohl die Carotinoide auch zu PC4 beitragen. Da die Varianz und damit der Informationsgehalt der einzelnen Hauptkomponenten sukzessive abnimmt, deutet der Plot von PC3 aufgetragen gegen PC4 auf minimale Unterschiede zwischen den Datensätzen von Tag 4 und Tag 8 hin (s. Abb. 65b).

Bei der durchgeführten PCA haben sich im Fall der ersten zwei Hauptkomponenten keine voneinander separierten Datenpunktwolken ausgebildet, wie man es bei eindeutig auftretenden Unterschieden in den Spektren erwarten würde. Diese Separation erfolgte aber im Fall von PC3 und PC4, die aber nur in einem geringen Maße zur Gesamtinformation beitragen. Das unterstützt aber die durch den Vergleich der Raman-Spektren gewonnene Erkenntnis, dass die Spektren sich sowohl von Tag zu Tag als auch von Replikat zu Replikat innerhalb eines Tages nur in der Peakintensität unterscheiden, wobei die Intensitätsverhältnisse der einzelnen Peaks zueinander konstant bleiben.

4.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus den mit Hilfe der spontanen Raman-Spektroskopie erhaltenen Spektren einzelner Algenzellen folgende Schlüsse gezogen werden konnten. Die Raman-Spektren einzelner Algen sind hauptsächlich von Raman-aktiven Molekülschwingungen dominiert, die entweder von Carotinoiden oder Lipiden verursacht werden. Die C=O-Resonanz der Carbonyl-Gruppe bei 1750 cm^{-1} liefert einen Hinweis auf das Vorhandensein von Komplexen aus Di- und Triacylglyceriden in den Lipid-Tröpfchen, die für die Speicherlipide charakteristisch sind. Durch den Vergleich der Spitzenintensitäten der Peaks, die gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren zugeordnet werden können, kann eine tendenzielle Zunahme der gesättigten Fettsäuren

mit zunehmender Einwirkzeit der Wachstumsfaktoren beobachtet werden. Unter Berücksichtigung des Messfehlers müssen allerdings weitere Raman-Messungen durchgeführt werden, um dieses Verhalten und somit das Potenzial von *Monoraphidium neglectum* zur Kraftstoffgewinnung zu verifizieren.

Die aus den Raman-Daten gezogenen Schlüsse stimmen mit den Ergebnissen der chromatographischen Analyse überein, die allerdings in Bezug sowohl auf die den Messungen vorausgehende Lipid-Extraktion als auch auf die Messzeit selbst sehr zeitaufwendig ist. Eine Belichtungszeit, die für die Aufnahme eines Raman-Spektrums benötigt wird, beträgt lediglich 60 s. Darüber hinaus kann die Lipidanreicherung in Algen mit der spontanen Raman-Spektroskopie ohne zusätzliche Präparation *in vivo* verfolgt werden.

Basierend auf der Hauptkomponentenanalyse lässt sich sagen, dass es nur marginale Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Algen gibt, d. h. das Verhalten eines extrahierten Lipid-Gemisches könnte auf das Verhalten einzelner Zellen übertragen werden. Um dies aber eindeutig zu verifizieren, müssten in zukünftigen Untersuchungen die Raman-Messungen mit einer Wellenlänge durchgeführt werden, die keine Zellkomponente resonant anregt. Da die Carotinoide sich im infraroten Bereich resonant anregen lassen und die Raman-Spektren dominieren, kommen die anderen eventuell im Spektrum vorhandenen Raman-Peaks geringer Intensität nicht zum Vorschein. Somit würden sich für die zukünftigen Raman-Untersuchungen Wellenlängen im Vis-Spektralbereich anbieten. Allerdings liegt die Absorption von Chlorophyll und Carotinoiden im blauen und die Emission der Eigenfluoreszenz der Carotinoide im grünen Spektralbereich (vgl. Kap. 4.2.4). Eine erhöhte Absorption würde zu Verlusten der eingestrahlten Leistung führen. Dies könnte mit höheren Laserleistungen kompensiert werden, was jedoch zur laserinduzierten Zerstörung der lebenden Zellen führen würde. Da die Konzentration von Carotinoiden in den Algen in der Regel auf ppm-Skala liegt, könnte eine Anregung im grünen Spektralbereich, z. B. 514 nm, in Betracht gezogen werden. Sollte der Eigenfluoreszenzbeitrag der oben genannten Pigmente doch hoch sein, müssten Fluoreszenz eliminierende Methoden, wie Wellenlängen-modulierte Raman-Spektroskopie oder Time-Gated-Raman-Spektroskopie, zum Einsatz kommen (vgl. Kap. 2.2.3).

4.3 Verstärkung des Raman-Signals von Nanofilmen in einer optischen Nanokavität

Die Raman-Analyse von dünnen Schichten mit Abmessungen im Bereich von wenigen Nanometern stellt eine große Herausforderung dar. In Kapitel 4.3.1 wird die Verwendung einer optischen Nanokavität zur Verstärkung von Raman-Signalen mit alternativen Verstärkungsmechanismen verglichen. Daraufhin werden in Kapitel 4.3.2 die Funktionsweise und Integration einer solchen Nanokavität in das bestehende Raman-System beschrieben. Der Demonstration der prinzipiellen Signalverstärkung in der Kavität anhand einer fluoreszierenden Probe (s. Kap. 4.3.3) schließen sich in Kapitel 4.3.4 Raman-Messungen an dünnen Schichten, wie Polymeren und Graphen, an. Anschließend werden die Ergebnisse in Kapitel 4.3.5 zusammengefasst.

4.3.1 Motivation

Da die Signalintensität der spontanen Raman-Streuung proportional zum Probenvolumen ist, erschwert dies deutlich die Analyse von dünnen Filmen mit einer Schichtdicke von nur wenigen Nanometern, wie Phospholipid-Schichten oder selbstaggregierenden Monolagen. Darüber hinaus überlagern Hintergrundsignale der vergleichsweise dicken Trägermaterialien (mit Dicken im Bereich von 170 μm) das ohnehin schwache Raman-Signal der dünnen Schicht. Nicht immer ist dann eine nachträgliche Separation des Raman-Signals vom Hintergrundsignal durch mathematische Methoden (s. Kap. 3.4.1) möglich. Auch durch eine Erhöhung der Integrationszeit des verwendeten Detektors bleibt das Raman-Signal meistens vom Hintergrundsignal verdeckt. Wählt man längere Belichtungszeiten, so wird auch das störende Substratsignal erhöht. Somit lässt sich keine Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses erreichen. Aufgrund der Proportionalität sowohl des Raman- als auch des Hintergrundsignals zur einfallenden Laserleistung gilt das gleiche auch für den Einsatz von höheren Laserleistungen.

Nur bei wenigen, besonders robusten Proben ist die UV-resonante Raman-Streuung eine Möglichkeit zur Verstärkung des Raman-Signals. Diese ist sowohl auf die λ^{-4} -Abhängigkeit der Raman-Intensität als auch auf die resonante Anregung der zu untersuchenden Probe in diesem Wellenlängenbereich (244-364 nm) zurückzuführen. Takenaka et al. haben UV-resonante Raman-Messungen von Azobenzol-haltigen Monolagen vorgestellt, wobei jedoch eine nachfolgende Untersuchung der Integrität der Probe nach den Messungen dort nicht gezeigt wurde [221]. Diese Methode setzt die Resonanz bestimmter Probenbestandteile im UV-Bereich voraus und eignet sich darüber

hinaus aufgrund der möglichen Photozerstörung nur bedingt für die Analyse von organischen Schichten bzw. Monolagen von Biomolekülen.

In Kapitel 2.2.3 wird gezeigt, dass sich mittels SERS eine signifikante Verstärkung des Raman-Signals und ein erhöhtes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis durch den Einsatz von metallischen Nanopartikeln erzielen lassen. Bringt man diese Nanopartikel in Kontakt mit einer zu untersuchenden dünnen Schicht, so werden bei einer optischen Anregung kollektive Oszillationen der freien Leitungselektronen in den Edelmetallstrukturen induziert. Diese haben eine Erhöhung des lokalen elektromagnetischen Feldes in deren direkter Umgebung und damit auch eine Erhöhung des Raman-Signals von der dünnen Schicht zur Folge (vgl. Kap. 2.2.3 und 4.4). Auf diese Weise konnte zum Beispiel von An et. al eine Monolage von Phospholipiden in Verbindung mit Silber-Nanopartikeln untersucht werden [222]. Trotz der Signalverstärkung ist diese Methode jedoch invasiv, weil die Nanopartikel in direkten Kontakt mit dem Analyten gebracht werden müssen. Unter Umständen kann das mit einer unerwünschten chemischen Veränderung der zu analysierenden Probe einhergehen.

Eine alternative Möglichkeit ein schwaches Raman-Signal zu verstärken, besteht in der Ausnutzung der Feldüberhöhung bei der Reflexion eines Laserstrahls mit der Intensität I an einem Spiegel. Diese Feldüberhöhung kommt dadurch zustande, dass sich der einlaufende und reflektierte Strahl überlagern und ein stehendes Wellenmuster bilden. An Positionen konstruktiver Interferenz herrscht so die quadrierte Intensität I^2 vor. Trägt man die zu untersuchende Probe auf die spiegelnde Oberfläche auf, so kommt es zu einer entsprechend stärkeren Anregung und damit auch zur stärkeren Raman-Emission. Ein Vorteil dabei ist, dass weder das Metall des Spiegels noch dessen Oberflächenbeschichtungen, wie z. B. Quarz oder Tantaloxid, ein nennenswertes Hintergrundsignal generieren oder es in einem Spektralbereich unterhalb von 200 cm^{-1} liegt, da diese Schutzschichten in der Regel aus Verbindungen relativ schwerer Elemente bestehen (vgl. Kap. 2.3). Ein Nachteil dabei ist, dass in dieser Konfiguration eine Intensitätsverstärkung um den Faktor ca. 4 nicht überschritten werden kann. Der Verstärkungsfaktor rührt daher, dass die zu untersuchende Schicht direkt auf der spiegelnden Oberfläche aufgetragen ist und die Raman-Streuung sowohl durch den fokussierten Laserstrahl als auch durch dessen fast hundertprozentige Rückreflexion erzeugt wird. Dies führt zur maximalen Verstärkung des Raman-Signals um einen Faktor 2. Der nach oben abgestrahlte Lichtanteil der Raman-Streuung, der in der Regel für die Rückwärtsdetektion verloren geht, wird ebenfalls durch den benutzten Spiegel zurückreflektiert. Im Idealfall führt dies auch zu einer Signalverstärkung von einem Faktor 2. Somit ergibt sich ein Faktor von ca. 4.

Eine deutlich höhere Feldverstärkung kann erreicht werden, indem ein Resonator durch einen Spiegel und einen halbdurchlässigen Spiegel gebildet wird, wobei die Ein- und Auskopplung des Lichts über den halbdurchlässigen Spiegel erfolgt. Die Feldüberhöhung wird also unter anderem durch den Transmissionsgrad des halbdurchlässigen Spiegels gegeben. Im Resonator selbst werden sowohl der einfallende Laserstrahl als auch das

Raman-Signal mehrfach hin- und herreflektiert. Aufgrund einer starken räumlichen Lokalisierung des einfallenden Lichts in einer oder mehreren Dimensionen auf einem kleinen Raum von der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts kommt es zu wiederholten Wechselwirkungen zwischen der Anregungsstrahlung und der zu untersuchenden Schicht [223]–[225]. Dies resultiert in einem erhöhten Raman-Signal, welches dann aus dem Resonator ausgekoppelt werden kann.

Bereits 1986 wurde das obige Prinzip auf die Untersuchung von DNA in einzelnen Lachs-Spermien angewandt, wobei sich das Erbgut überwiegend im Kopfteil des Spermiums konzentriert [226]. Im Rahmen ihrer Arbeit haben Kubasek et al. die Raman-Spektren gezielt von einzelnen Kopfteilen der Spermien aufgenommen und anschließend mit den mittels eines konventionellen Raman-Systems gemessenen Spektren der Spermien-Suspension verglichen. Dabei ergaben sich auffällige Unterschiede: Zum einen ließ sich eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im Vergleich zur konventionellen Raman-Spektroskopie beobachten und zum anderen gab es deutliche Differenzen zwischen dem Signal einzelner Kopfteile und dem gemittelten Signal vieler Spermien.

Im Allgemeinen werden optische Resonatoren durch zwei wesentliche Parameter charakterisiert:

- *Gütefaktor* (zeitliche Auflösung)
- *Modenvolumen* (räumliche Auflösung)

Ein idealer Resonator reflektiert das eingeschlossene Licht unendlich lange ohne Verluste durch Absorption oder Streuung. In der Realität ist dies nicht der Fall. Die Abweichung vom idealen Verhalten und somit das Maß für die Dämpfung eines Schwingungssystems wird als Qualitätsfaktor oder Gütefaktor Q bezeichnet. Er wird als Verhältnis zwischen der im Resonator eingeschlossenen und aus dem Resonator ausgekoppelten Strahlung definiert. Je höher dieser Faktor ist, desto länger ist die Zeit, über die die Lichtenergie ohne nennenswerte Verluste im Resonator gespeichert bleibt. Als Modenvolumen V_{Moden} bezeichnet man das Volumen, das die in der Kavität auftretenden Lichtmoden einschließen.

Die Intensität $I_{Resonator}$ innerhalb eines Resonators ist bei konstanter eingekoppelter Leistung proportional zu [227]:

$$I_{Resonator} \propto \frac{Q}{V_{Moden}} \quad (4.1)$$

Prinzipiell gibt es drei verschiedene Arten von Resonatoren, die sich in ihrer Geometrie und der erreichbaren Signalverstärkung unterscheiden.

- *Flüstergalerie-Resonator (engl. Whispering-Gallery Mode Resonator, WGM-Resonator)*

Das ins System eingestrahlte Licht wird an der Oberfläche von mikrometergroßen rotationssymmetrischen Strukturen (Kugeln, Toroiden, Kelchen) geführt. Dies geschieht durch interne Totalreflexion an der Grenzfläche zum umgebenen Medium, welches einen niedrigeren Brechungsindex aufweist. Das im Resonator verstärkte Lichtfeld dringt als evaneszentes Feld in die Probe ein, wodurch eine feldverstärkte Anregung erreicht wird [228]. Dieser Verstärkungsmechanismus wurde beispielsweise von Armani et al. zur Detektion einzelner Proteine in einem Toroid-Resonator ausgenutzt [224]. In der Praxis werden maximal Verstärkungsfaktoren von 10^3 - 10^4 realisiert. Da es sich um Resonatoren mit einer vergleichsweise hohen Güte handelt, ist die erzielte Signalvergrößerung wiederum sehr schmalbandig [229]. Für die Analyse komplexer, unbekannter Materialschichten wären jedoch Resonatoren mit geringerer Güte von Interesse, die eine spektral breitbandigere Anregung möglichst vieler Raman-Moden und deren gleichzeitiger Signalverstärkung ermöglichen.

- *Defekte in photonischen Kristallen*

Durch die Störung der Periodizität, z. B. mittels Elektronenstrahlolithographie, lassen sich gezielt Defekte in einen photonischen Kristall einbauen. Diese ermöglichen die räumliche Lokalisierung von eingestrahlttem Licht um die Defekte herum und machen den photonischen Kristall dementsprechend zum Mikrohohlresonator [230]. Mit dieser Methode könnte man theoretisch Verstärkungsfaktoren bis zu 10^4 erzielen [227], [231]. Allerdings ist die Herstellung von solchen Kavitäten mit einem hohen Aufwand verbunden und sie lassen sich aufgrund ihrer starren Geometrie nicht ohne weiteres für einen großen Spektralbereich anpassen.

- *Fabry-Pérot-Resonator*

Das bekannteste Konzept ist ein Fabry-Pérot-Resonator, der aus zwei planparallelen hochreflektierenden Platten besteht, zwischen denen sich die zu untersuchende Probe befindet. Das eingeschlossene Licht wird zwischen den beiden spiegelnden Oberflächen mehrfach hin- und herreflektiert, bis es den Resonator bei erfüllter Resonanzbedingung wieder verlassen kann:

$$\lambda = \frac{2 \cdot d}{N} \quad (4.2)$$

Dabei ist λ die Wellenlänge des Lichts, d der Spiegelabstand und N eine ganze Zahl.

Fainstein et al. haben bereits gezeigt, dass eine solche planare Anordnung zur Verstärkung des Raman-Signals genutzt werden kann [232]. Einerseits zeichnet sich ein solcher Resonator durch einen direkten Zugang zum im Resonator zwischengespeicherten Licht aus (direkte Ein- und Auskopplung von Licht ohne zusätzliche Anordnungen). Andererseits besitzt er den entscheidenden Nachteil, der in der schlechten Stabilität und in der aufwendigen Justage besteht. Sogar geringste Verkippungen der Spiegel haben große Verluste des eingeschlossenen Lichts und damit auch des Raman-Signals zur Folge. Der theoretische Verstärkungsfaktor kann im Fall einer Mikrosäule-Kavität (eine Ausführung der Fabry-Pérot-Resonatoren) bis zu 10^3 betragen. In realen Aufbauten ist dieser aufgrund der geringen Stabilität jedoch kleiner [227].

Die Effizienz der bereits aufgelisteten Resonatortypen kann noch weiter gesteigert werden, indem man sie mit anderen Verstärkungsmechanismen, wie z. B. der kohärenten Raman-Streuung oder der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie, kombiniert [233], [234].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine Nanokavität aufgebaut und verwendet, die unter Berücksichtigung der Nachteile anderer Resonatortypen optimiert wurde. Die verwendete Geometrie und ihre Vorteile werden im nachfolgenden Kapitel 4.3.2 diskutiert.

4.3.2 Geometrie der Nanokavität

Ein Fabry-Pérot-Resonator (FPR) weist ein optimales Verhältnis zwischen Verstärkung und Breitbandigkeit auf und kann ohne Nanofabrikationsmethoden hergestellt werden. Eine Variante davon besteht aus zwei gegenüberstehenden planparallelen Spiegeln im Abstand d , wobei einer davon teildurchlässig ist (s. Abb. 66). Das Licht tritt durch den teildurchlässigen Spiegel, parallel zu dessen Flächennormalen in den Resonator ein. Darin wird es mehrfach zwischen den beiden Spiegeln reflektiert. Beträgt die Resonatorlänge ein ganzzahliges Vielfaches der halben Wellenlänge (Resonanzbedingung) (vgl. Gl. 4.2), so bilden sich zwischen den Spiegeln aufgrund konstruktiver Interferenz stehende Wellen aus. An den Spiegeloberflächen bilden sich dabei die Knotenpunkte des Feldes. Ein kleiner Teil des Lichtes wird über den teildurchlässigen Spiegel ausgekoppelt. Die Intensität im Resonator ist dabei gegenüber der Intensität des treibenden Lichtfeldes erhöht, wobei diese Erhöhung vor allem durch die Transmittivität des teildurchlässigen Spiegels bestimmt ist.

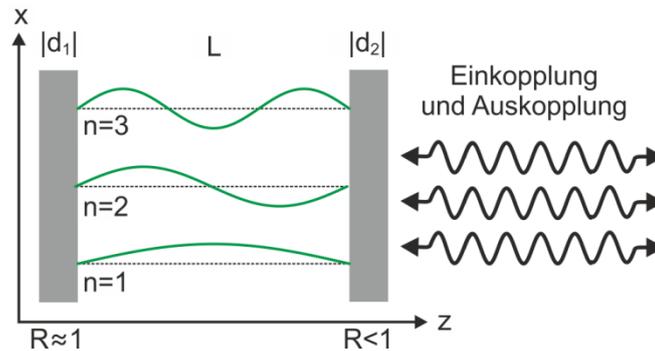


Abb. 66: Schematische Darstellung eines FPR, der aus zwei gegenüberstehenden planparallelen Spiegeln besteht. Der Abstand der beiden Spiegel ist dabei d . Einer der beiden Spiegel ist hochreflektierend ($R \approx 1$). Der zweite Spiegel dient zur Lichtauskopplung aus der Kavität, weshalb ein teildurchlässiger Spiegel ($R < 1$) verwendet wird. Ist die Resonanzbedingung erfüllt, so bilden sich in der Kavität stehende Wellen aus, die auch als longitudinale Moden bezeichnet werden. Deren Volumen kann durch den Abstand der beiden Spiegel eingestellt werden. In grün sind die longitudinalen Moden erster, zweiter und dritter Ordnung eingezeichnet (adaptiert aus [235]).

Bei einem FPR erfolgt die Ein- und Auskopplung von Licht direkt über die Resonatorspiegel. Bei einer WGM-Kavität benötigt man hingegen zusätzliche optische Elemente, wie z. B. eine Glasfaser, um das Licht in das System ein- und wieder auszukoppeln. Dies setzt die aufwendige Phasen Anpassung der evaneszenten Felder des Resonators und des verwendeten Wellenleiters voraus [236].

Trotz der bereits genannten Vorteile besitzt ein Planspiegelresonator den Nachteil, dass die Stabilität gegenüber von mechanischen Erschütterungen, Temperatur- und Druckschwankungen gering ist [237]. Infolge störender externer Einflüsse treten unerwünschte Signalverluste in der Kavität auf. Möchte man die Kavität zur Untersuchung von dünnen Schichten verwenden, so stellt sich die Stabilisierung zweier Spiegel bei einem Abstand von einigen hundert Nanometern als aufwendig heraus [238]. Sie kann beispielsweise durch die axiale Verschiebung eines Spiegels mittels eines Nanopositioniersystems⁸ erfolgen [237].

Alternativ lässt sich eine Fabry-Pérot-Anordnung durch die Kombination aus einem planaren und einem konvexen Spiegel realisieren. Letzterer sorgt dabei für die Stabilisierung des Resonators, weil der Kontaktpunkt zwischen dem planaren und gekrümmten Spiegel die einzige Kontaktfläche zwischen den beiden spiegelnden Oberflächen ist. Dadurch ist das System selbstzentrierend und selbststabilisierend. Darüber hinaus ermöglicht die sphärische Form des konvexen Spiegels eine Variation der Resonatorlänge, die vom Berührungspunkt der beiden Spiegel aus gesehen nach außen hin mit der Spiegelkrümmung zunimmt. Die Kavität ist somit über die Wahl des Abstandes vom Zentrum aus durchstimmbare. Eine detaillierte theoretische Beschreibung des plan-konvexen Resonators wird in [239] und [240] gegeben.

⁸ Piezo-Verschiebetisch mit Nanopositionierung

Der im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Nanoresonator (s. Abb. 67) setzt sich aus einem teildurchlässigen planaren und einem hochreflektierenden gekrümmten Spiegel zusammen. Der planare Spiegel besteht aus einem gereinigten BK7-Substrat mit einer Dicke von 170 μm und einer 40 nm dicken aufgedampften Silberschicht. Auf dieses reflektierende Substrat wird die zu untersuchende Probe aufgetragen. Zur Herstellung des gekrümmten Spiegels wurde eine plankonvexe Linse (Thorlabs, LA-1560, unbeschichtet, Durchmesser: 25 mm, Brennweite 150 mm) als Substrat verwendet. Auf der gekrümmten Seite wurde eine 60 nm dicke Silberschicht aufgedampft. Die Silberschichten wurden mittels einer Hochvakuumbedampfungsanlage Univex 350 von Leybold abgeschieden. Die Herstellung der hier verwendeten Spiegel erfolgte durch Dr. Alexey Chizhik aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Enderlein. Diese beschichtete Linse wird mit der gekrümmten Seite auf dem planaren Spiegel mit der darauf befindlichen Probe platziert. Aufgrund der geringen Krümmung des konvexen Spiegels kann seine Oberfläche bei den zur Verfügung stehenden Fokusdurchmessern (vgl. Tab. 3) näherungsweise als planar angesehen werden.

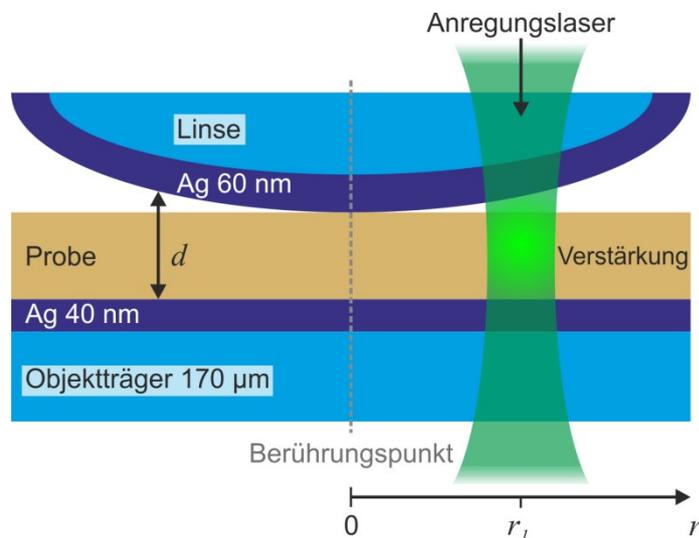


Abb. 67: Schematischer Aufbau der verwendeten Nanokavität, bestehend aus einem planaren und einem konvexen Spiegel. Die Länge der Kavität d variiert mit dem Krümmungsradius des gekrümmten Spiegels. Nur im Zentrum $r = 0$, wo dieser auf dem planaren Spiegel aufliegt, beträgt die Resonatorlänge $d \leq \lambda/2$. Die einzelnen Schichten sind nicht maßstabgetreu dargestellt.

Die Güte Q eines Resonators wird in erster Linie durch die Transmittivitäten der beiden spiegelnden Oberflächen bestimmt. Die Transmission der hier verwendeten Spiegel wurde mit Hilfe eines Spektrometers (Lambda 25, Perkin Elmer) bestimmt (s. Abb. 68). Für Referenzmessungen wird es sich als nützlich erweisen, den Resonator auch ohne verspiegelte Grenzflächen zu verwenden. Dadurch kann die Güte des Resonators deutlich gesenkt werden, während alle anderen Versuchsparameter konstant gehalten werden können (s. Kap. 4.3.3).

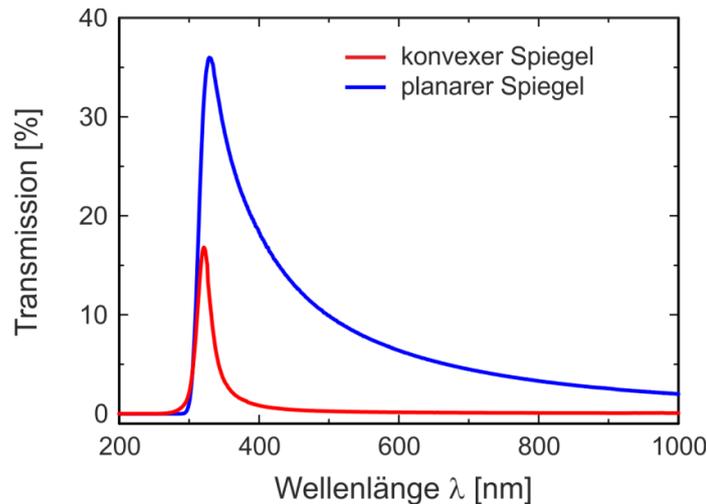


Abb. 68: Transmissionskurven des konvexen (rot) und des planaren (blau) Spiegels. Der gekrümmte Spiegel weist eine Reflexion von mehr als 99% im sichtbaren Wellenlängenbereich auf. Der planare Spiegel, über den die Ein- und die Auskopplung von Licht erfolgen, besitzt ebenfalls eine vergleichsweise hohe Reflektivität, transmittiert aber je nach der Wellenlänge im Bereich zwischen 400 nm und 1000 nm ca. 2.5-15%.

Die mit Silber beschichtete gekrümmte Linse besitzt eine Reflektivität von mehr als 99% im Vis-Spektralbereich (s. Abb. 68, rote Kurve), d. h. die Auskopplungsverluste durch diesen gekrümmten Endspiegel sind gering. Der planare Endspiegel, über den die Ein- und Auskopplung in die Nanokavität stattfinden, lässt hingegen einen geringen Lichtanteil von ca. 2.5-15% (je nach der verwendeten Anregungswellenlänge im Vis- und NIR-Bereich) durch (s. Abb. 68, blaue Kurve). Dadurch wird allerdings der Gütefaktor Q des Resonators verringert.

Die Güte eines FPR Q lässt sich mit der Formel

$$Q = \frac{\pi \sqrt{R_1 \cdot R_2}}{1 - R_1 \cdot R_2} \quad (4.3)$$

bestimmen, wobei R_1 und R_2 die Reflektivitäten der beiden Spiegel sind.

Für eine Anregungswellenlänge von 514 nm beträgt die Resonatorgüte für silberbeschichtete Spiegel $Q_{\text{beschichtet}} = 31$. Im Vergleich dazu ist die Güte für einen Resonator ohne verspiegelte Grenzflächen $Q_{\text{unbeschichtet}} = 0.17$ und somit deutlich geringer. Ein Wert von $Q < 0.5$ bedeutet, dass man sich im Kriechfall befindet und die Dämpfung des Resonators dementsprechend sehr hoch ist.

Ein wichtiger Parameter, der bei der Wahl der Endspiegel des Resonators berücksichtigt werden muss, ist die Oberflächenrauigkeit. Erste Versuche wurden in Anlehnung an die Arbeit von Khoptyar et. al. mit einer Linse (Thorlabs, LA -1560, unbeschichtet,

Durchmesser: 25 mm, Brennweite: 150 mm) durchgeführt, die eine Oberflächengenauigkeit von $3/2 \lambda$ aufwies [240]. Der Vergleich mit einer hochqualitativ verarbeiteten Linse mit einer Oberflächengüte von $1/10 \lambda$ (Edmund Optics, TechSpec, 67-098, unbeschichtet, Durchmesser: 25 mm, Brennweite: 150 mm) hat ergeben, dass mit abnehmender Oberflächenrauigkeit der Linse konzentrische Interferenzringe in der Kavität deutlicher und schärfer zu sehen sind (s. Abb. 69). Basierend darauf wurde für die weiteren Versuche eine plankonvexe Linse mit einer Oberflächengüte von $1/10 \lambda$ benutzt. Diese kann bei Bedarf mit Silber beschichtet werden.

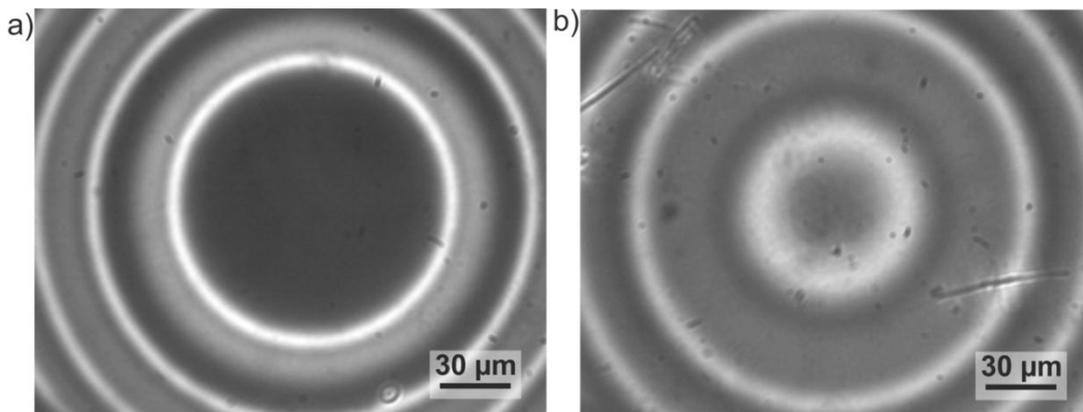


Abb. 69: Vergleich des Einflusses der Oberflächengüte der verwendeten Linsen auf die Abbildungsqualität der Interferenzringe in der Kavität anhand der Durchlichtaufnahmen: In a) ist eine Linse mit einer Oberflächengenauigkeit von $1/10 \lambda$ und in b) eine Linse mit einer Oberflächengenauigkeit von $3/2 \lambda$ gezeigt. Das Bild wurde mit einem 40x Trockenobjektiv (NA 0.75) und einer Weißlichtquelle aufgenommen. Mit steigender Oberflächengüte sind die Interferenzringe deutlich schärfer.

Die oben erwähnten Interferenzringe werden auch als Newton'sche Ringe bezeichnet. Sie bilden sich durch die Verwendung einer schwach gekrümmten Linse und einer planaren Glasplatte unter senkrecht einfallender Beleuchtung sowohl in der Transmission als auch in der Reflexion um den Berührungspunkt beider Spiegel aus. Tritt Licht in den Resonator ein, so kommt es zu einer ersten Reflexion an der Rückseite der gekrümmten Linse, an der der Übergang der Lichtstrahlen aus einem optisch dichteren (Linse, $n_{Linse} \approx 1.5$) in ein optisch dünneres (Luft, $n_{Luft} \approx 1$) Medium erfolgt (s. Abb. 70a). Die erneute Reflexion findet beim Übertritt von Licht aus einem optisch dünneren (Luft, $n_{Luft} \approx 1$) in ein optisch dichteres (Glasplatte, $n_{Glasplatte} \approx 1.5$) Medium statt. Die Überlagerung der reflektierten kohärenten Strahlen an den beiden Grenzflächen führt zur Entstehung der Newton'schen Ringe (s. Abb. 70b). Das Aussehen der konzentrischen Kreise lässt Rückschlüsse auf die Qualität der gekrümmten Linse zu: Die Abweichungen vom rotationssymmetrischen Interferenzmuster deuten darauf hin, dass die Linse nicht exakt kugelförmig ist. Ausfransungen der Newton'schen Ringe weisen auf Mängel in der Güte der optischen Oberfläche hin.

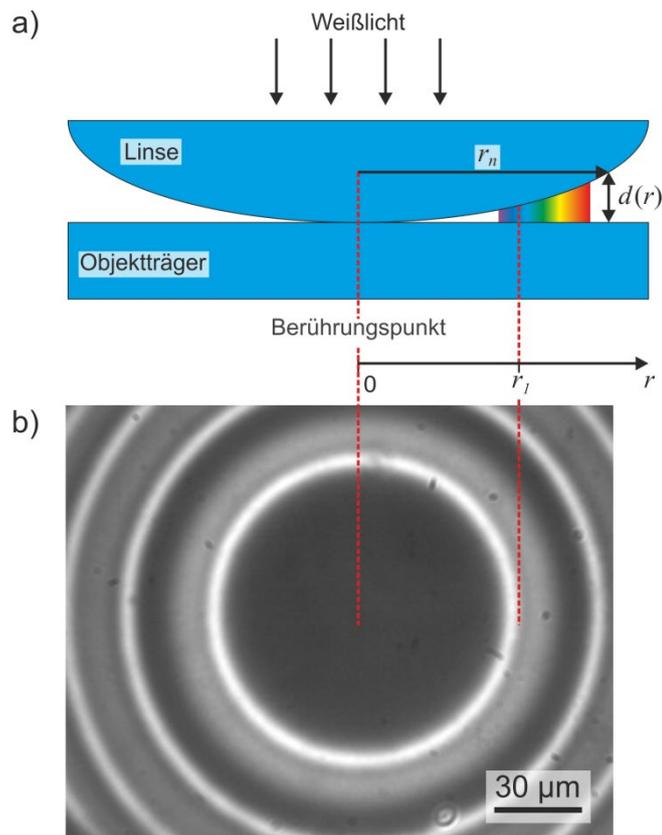


Abb. 70: a) Schematische Darstellung der Anordnung zur Beobachtung Newton'scher Ringe, die aus einer schwach gekrümmten Linse und einer planaren Glasplatte besteht. Die veränderliche Dicke des Luftspaltes ist mit d bezeichnet und ist zugleich die Resonatorlänge, der Radius des jeweiligen Interferenzringes ist r_n . b) Eine exemplarische Schwarz-Weiß-Aufnahme der Transmission durch den Resonator unter Beleuchtung mit einer Weißlichtquelle. Die Detektion erfolgte mit einem 40x Trockenobjektiv (NA 0.75). Exemplarisch wurde der Radius des ersten Ringes r_1 eingezeichnet.

Wenn die Resonatorlänge d das Interferenzkriterium (s. Gl. 4.4) erfüllt, kann das senkrecht einfallende Anregungslicht den Resonator durchqueren und an diesen Stellen tritt eine erhöhte Lichtintensität auf (s. Abb. 70b).

$$m \cdot \lambda = 2 \cdot n \cdot d \quad (4.4)$$

Dabei ist m die Ringordnung, λ die Anregungswellenlänge und n der Brechungsindex des Resonatormediums.

Dementsprechend stellen die hellen Bereiche Intensitätsmaxima und die dunklen Bereiche Intensitätsminima dar. Die Ordnungszahlen der Maxima bzw. Minima werden den Interferenzringen vom Kontaktpunkt nach außen zugeordnet. Mit steigender Ordnung nimmt die Intensität des jeweiligen Maximums bzw. Minimums ab.

Wenn man eine monochromatische Lichtquelle verwendet und das transmittierte Licht detektiert, dann zeigen die Newton'schen Ringe das oben beschriebene Verhalten. Bei Beleuchtung mit Weißlicht dagegen kommt es zu einer Regenbogenfärbung der Ringe. Diese entsteht durch die radiale Variation der Resonatorlänge (s. Abb. 70b). An jedem Punkt r wird für eine andere Wellenlänge die Interferenzbedingung erfüllt und entsprechend Licht transmittiert. Dabei durchläuft man bei Erhöhung des Abstandes r die gesamte Oktave des optischen Spektrums einmal, bis erneut die Interferenzbedingung, nun aber mit einer höheren Schwingungsmode, erreicht wird. Da der Abstand zwischen den beiden Grenzflächen nicht-linear ist, liegen die abwechselnden hellen und dunklen Ringe mit zunehmendem Abstand vom Kontaktpunkt der beiden Flächen immer näher beieinander, bis sie schlussendlich nicht mehr unterscheidbar sind.

4.3.3 Proof-of-Principle der Signalverstärkung in der Nanokavität

Im Folgenden wird ein Proof-of-Principle-Experiment zur Signalverstärkung innerhalb der aufgebauten Nanokavität anhand einer fluoreszierenden Probe vorgestellt. Dazu werden zwei Resonatoren gebildet. Der eine plan-konvexe Resonator (Resonator 1) besitzt silberbeschichtete Grenzflächen, während der andere plan-konvexe Resonator (Resonator 2) aus einer unbeschichteten Linse und einem unbeschichteten planaren Substrat besteht und somit eine deutlich geringere Güte aufweist (vgl. Kap. 4.3.2).

In den beiden Systemen hängt die Intensität des von der Probe emittierten Signals von der Position r ab (vgl. Abb. 70), d. h. die Raman-Intensität wird unter anderem dadurch bestimmt, ob die Spektren am Ort konstruktiver oder destruktiver Interferenz aufgenommen werden. Die Ordnung des jeweiligen hellen Rings, also des Maximums, spielt ebenfalls eine Rolle: Die höchste Intensität erhält man auf dem Ring erster Ordnung, dem Ort der maximalen Feldverstärkung in der Kavität. Die Abhängigkeit der Signalintensität des aus dem Resonator ausgekoppelten Lichts von der Ordnungszahl des Ringes wird im Folgenden experimentell demonstriert.

Die Raman-Messungen wurden überwiegend im Bereich $r < \lambda/2$, also in der zentralen Region der Kavität, durchgeführt. Für die zu analysierenden Proben bedeutet dies, dass folgende Anforderungen erfüllt werden müssen, damit sie für die Untersuchung in der Nanokavität geeignet sind:

- Transparenz bzw. minimale Absorption im Vis-Spektralbereich
- Schichtdicke der Probe $< \lambda/2$
- Raman-Aktivität der Substanz

Da die Verwendung einer Kavität die Untersuchung dünner Schichten ermöglichen soll, ist die aufgeführte Anforderung an die Schichtdicke keine Einschränkung. Auch die

Absorption solch dünner Schichten ist meistens vernachlässigbar gering. In Kapitel 4.3.4 wird die Kavität zur Untersuchung von Polymeren, Lipid-Multilagen und Graphen verwendet.

Zur Vorbereitung der kavitätsverstärkten Raman-Messungen wird das Funktionsprinzip der Nanokavität anhand einer fluoreszierenden Probe verifiziert. Dazu wurde der lipophile Farbstoff Rhodamin B in Immersionsöl (Zeiss, 518F) gelöst und zentrifugiert [241]. Zu den typischen Lösungsmitteln gehören Wasser und Ethanol, im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eine dickflüssige und nicht-flüchtige Substanz benutzt, um eine mögliche Verdunstung und damit einhergehende Konzentrationsänderung im Fokusvolumen zu vermeiden.

Es wurden 10 μl dieser Farbstoff-Lösung ($c = 10^{-5} \text{ mol/l}$) auf ein planares silberbeschichtetes Substrat durch Pipettieren aufgebracht und mit dem ebenfalls silberbeschichteten sphärischen Spiegel abgedeckt (Resonator 1). Das Auflegen des Spiegels führt zur Verdrängung des überschüssigen Öls um den Berührungspunkt der beiden Resonatorspiegel. Mit der Durchlichtmikroskopie wurde unter Weißlicht-Beleuchtung sichergestellt, dass die Newton'schen Ringe ortsfest sind. Würden mechanische Instabilitäten auftreten, so würden die Ringe über die Zeit wandern. Anhand der Transmissionsmikroskopie-Aufnahmen der Newton'schen Ringe konnte der Kontaktpunkt der beiden Spiegel identifiziert werden. Daraufhin wurde der Farbstoff Rhodamin B in der Kavität mit einem fokussierten Laserstrahl der Wellenlänge 514 nm zur Fluoreszenz gebracht. Mittels der galvanometrischen Scan-Spiegel (vgl. Kap. 3.1) wurde die Probenoberfläche abgerastert und die Fluoreszenz-Intensität Punkt für Punkt gemessen (hier: um den Berührungspunkt der beiden Spiegel, Auflösung: 1024x1024 Pixel, Belichtungszeit: 16 s). Daraus ergibt sich das ortsaufgelöste Fluoreszenzbild (s. Abb. 71a). In der resultierenden Fluoreszenzabbildung sieht man das Auftreten der Newton'schen Ringe, die zum Teil ausgefranst sind. Diese Ausfransungen können sowohl auf Defekte des gekrümmten Spiegels durch mehrfaches Verwenden als auch auf eine inhomogene Verteilung des Farbstoffes in der Immersionsöl-Farbstoff-Mischung hindeuten.

In Abbildung 71b ist eine exemplarische Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der Ringordnung m dargestellt. Die Kurve ergibt sich durch die Mittelung entlang der vertikalen Achse, wobei der Bereich (s. Abb. 71a, gelbes Rechteck) sehr klein gewählt wurde, damit die Krümmung der Newton'schen Ringe die gemittelte Intensität nicht beeinflusst. Bei einer (nahezu) idealen Spiegeloberfläche würde man symmetrische Lorentz-Peaks erwarten, deren Intensität mit steigender Ordnung abnimmt. Stattdessen lassen sich etwas verbreiterte Peaks beobachten und die Intensität von $m = 5$ ist beispielsweise größer als die Intensität von $m = 4$.

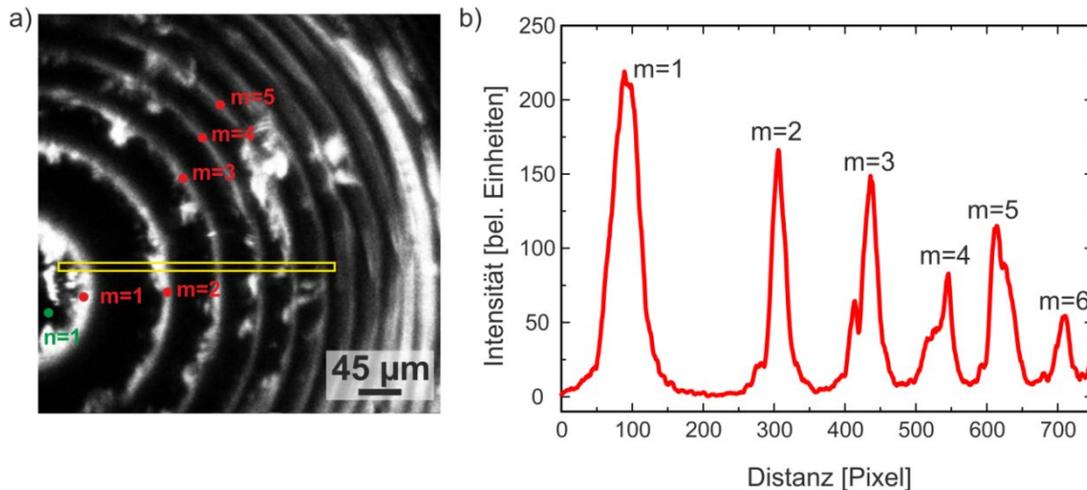


Abb. 71: a) Ortsaufgelöste Fluoreszenzabbildung der Newton'schen Ringen in der Kavität (Resonator 1). Es wurde eine in Immersionsöl gelöste Rhodamin B-Mischung ($c = 10^{-5}$ mol/l) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem 20x Trockenobjektiv (NA 0.4) und einer Anregungswellenlänge von 514 nm am konfokalen Versuchsaufbau. Das Fluoreszenzlicht wurde über einen Photomultiplier detektiert. Das Bild besteht aus 1024x1024 Pixeln und die Scan-Zeit pro Linie beträgt 16 ms. Helle Ringe repräsentieren Intensitätsmaxima und dunkle Ringe Intensitätsminima. Die in rot eingezeichneten Punkte und der in grün eingezeichnete Punkt markieren die Probenpositionen, an denen Fluoreszenzspektren (s. Abb. 72) aufgenommen wurden. Dabei bedeuten die einzelnen Zahlen m_n die Ordnungszahl des jeweiligen Maximums und n_n die Ordnungszahl des jeweiligen Minimums. Mit einem gelben Rechteck ist der Probenbereich umrandet, aus dem die in b) gezeigte Intensitätsverteilung durch Mittelung berechnet wurde. In b) ist eine exemplarische Intensitätsverteilung des in a) gelb markierten Bereichs in Abhängigkeit von der Ringordnung m_n gezeigt.

Es wurden verschiedene Punkte im aufgenommenen Fluoreszenzbild (s. Abb. 71a) ausgewählt und mit Hilfe der galvanometrischen Scan-Spiegel gezielt angefahren, um dort Fluoreszenz-Spektren aufzunehmen (s. Abb. 72). Die Punkte $m = 1, 3, 5$ sind Intensitätsmaxima entsprechender Ordnung und $n = 1$ ist das Intensitätsminimum erster Ordnung. Bei der Wahl der Punkte wurde darauf geachtet, dass nur Orte auf den Ringen ausgewählt werden, an denen ein homogenes Fluoreszenz-Signal vorliegt. Dies wurde anhand der dazugehörigen Intensitätsverteilung sichergestellt.

Man erkennt deutlich die Abhängigkeit der Intensität des Fluoreszenz-Signals von der Ordnung der Ringe im Resonator. Das höchste Fluoreszenz-Signal erhält man auf dem Ring erster Ordnung $m = 1$ (s. Abb. 72, rote durchgezogene Kurve), danach nimmt es mit zunehmender Entfernung vom Kontaktpunkt und somit mit steigender Ordnungszahl ab. Wird das Spektrum an der Stelle eines Intensitätsminimums $n = 1$ aufgenommen, so ist auch das Fluoreszenz-Signal aufgrund der Auslöschung stark verringert (s. Abb. 72, grüne durchgezogene Kurve). Dessen maximale Intensität bei 560 nm ist ca. 72 mal geringer als die Intensität der Fluoreszenz, die im ersten Interferenzmaximum $m = 1$ detektiert wurde.

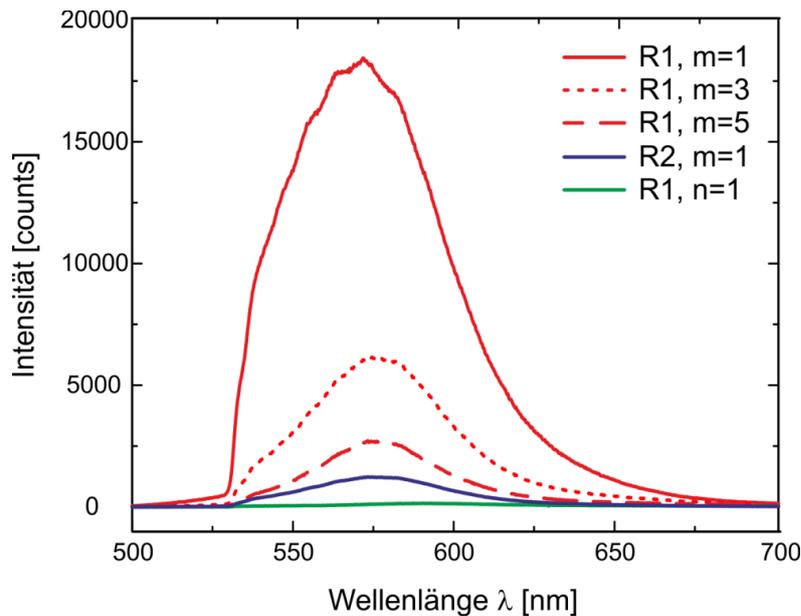


Abb. 72: Exemplarische Fluoreszenz-Spektren des Farbstoffs Rhodamin B in Immersionsöl in der Nanokavität hoher Güte R1 aufgenommen an den Positionen $m = 1, 3, 5$ und $n = 1$ (s. Abb. 71a). Zum Vergleich ist ein Spektrum gezeigt, aufgenommen im Interferenzmaximum erster Ordnung in der Nanokavität geringerer Güte R2. Die Spektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 514 nm, einer fokalen Leistung von 5 mW, einem 20x Trockenobjektiv (NA 0.4) und einer Belichtungszeit von 0.2 s aufgenommen.

Um die Verstärkung durch den hier verwendeten Resonator hoher Güte R1 zu beurteilen (s. Abb. 72, rote durchgezogene Kurve), wurde vom Farbstoff auch ein Spektrum innerhalb eines Resonators geringer Güte R2 als Referenz aufgenommen (s. Abb. 72, blaue Kurve). Würde man die Farbstoff-Lösung direkt auf einem planaren und unbeschichteten Substrat untersuchen, so würde sich das Anregungsvolumen im Vergleich zu Resonator 1 verändern. Deshalb erfolgten die Referenz-Messungen in Resonator 2, um die beiden Volumina gleich zu halten. Des Weiteren wurde auch der Abstand r identisch gewählt. Die Gegenüberstellung der Fluoreszenz-Signale, die im ersten Maximum $m = 1$ in der Kavität hoher Güte und der Kavität mit geringer Güte erzielt wurden, ergab eine Verstärkung von Faktor 16 ± 0.17 .

4.3.4 Anwendung der Nanokavität für die Untersuchung von Raman-aktiven dünnen Schichten

Nachdem die prinzipielle Anwendbarkeit der Nanokavität anhand einer fluoreszierenden Probe gezeigt wurde, erfolgen nun Messungen an Raman-aktiven Proben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene dünne Proben systematisch untersucht: Polymer-Schichten, Lipid-Multilagen, sowie Graphen. Aufgrund ihres stark ausgeprägten

und gut bekannten Raman-Spektrums kamen von den Polymeren vor allem Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polystyrol (PS) zum Einsatz.

Vor dem Übertrag der zu untersuchenden Schicht auf das mit Silber beschichtete planare Substrat (Resonator 1) muss dieses mit größter Vorsicht gereinigt werden. Die Silberschicht ist lediglich 40 nm dünn und kann durch geringe mechanische Einflüsse oder auch durch Chemikalien beschädigt werden. Vor dem Auftragen der zu untersuchenden Schicht wurde die Substratoberfläche mit gasförmigem Stickstoff abgeblasen, um mögliche Staubpartikel zu beseitigen. Daraufhin wurde das Substrat mit reinem Ethanol gespült und anschließend mit Stickstoff getrocknet.

Die Polymerfilme (PMMA und PS) wurden jeweils durch Aufschleudern mit einem Spincoater (KLM, SCI-10) auf ein planares Silbersubstrat aufgetragen, indem die Coatingsubstanz bei bereits rotierendem Substrat durch Pipettieren aufgebracht wurde.

Zur Herstellung der PS-Schicht wurde 1 mg PS-Pulver ($M = 100,000$ g/mol) in 1 ml Toluol gelöst und bei 35°C für 15 Minuten gevortext. Anschließend wurden $30\ \mu\text{l}$ der Mischung entnommen, auf das mit Silber beschichtete Substrat aufgetragen und mit 2000 Umdrehungen pro Minute 30 s aufgeschleudert. Für die Herstellung der PMMA-Schicht ($M = 50,000$ g/mol, gelöst in Chlorbenzol) wurden ebenfalls $30\ \mu\text{l}$ der 4% PMMA-Lösung bei 3000 Umdrehungen pro Minute 30 s lang aufgeschleudert.

Die auf diese Weise hergestellten Polymerschichten wurden anschließend mit einem Rasterkraftmikroskop (engl. *Atomic Force Microscope, AFM*) in Bezug auf ihre Dicke und die Oberflächenbeschaffenheit untersucht. Bei einem AFM tastet eine feine Messspitze⁹ am Ende eines Federbalkens (Cantilevers) das Höhenprofil der zu analysierenden Probe ab. Dabei werden die atomaren Kräfte zwischen dem Apex und der Probenoberfläche über die Verbiegung des Cantilevers gemessen. Diese und damit auch die resultierende Kraft hängen von der Topographie der Probe ab. Nach dem Hooke'schen Gesetz ist die Verbiegung des Federbalkens proportional zur Kraft und wird mit Hilfe eines auf die Spitze fokussierten Laserstrahls detektiert (Lichtzeigerprinzip). Die Messspitze kann sowohl in direktem Kontakt (Kontakt-Modus) mit der Probenoberfläche stehen oder sie zu keiner Zeit (Nicht-Kontakt-Modus) berühren. Die hier vorgestellten Messungen wurden im sogenannten „Tapping“-Modus durchgeführt, bei dem es sich um eine Mischung aus beiden oben genannten Modi handelt. Der Cantilever wird zu den senkrecht zur Probenoberfläche ausführbaren Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt und berührt die Probe am Umkehrpunkt jeder Schwingung. Die AFM-Aufnahmen liefern ein topographisches Bild der Probenoberfläche, wobei die derzeit erreichbare laterale Auflösung in der Größenordnung von wenigen Nanometern bis zum Subnanometerbereich liegt [242].

Die im Rahmen dieses Projekts vorgestellten AFM-Messungen wurden von Dr. Volker Walhorn aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dario Anselmetti durchgeführt. Ein

⁹ Typischerweise: Radius $< 10\ \text{nm}$

exemplarisches Höhenprofil ist in Abbildung 73 gezeigt. Man erkennt, dass sich ein poröses Polymernetzwerk ausbildet, wobei die einzelnen Löcher eine durchschnittliche Ausdehnung von ca. 300 nm aufweisen. Diese kommen vermutlich durch den Verdampfungsprozess des verwendeten Lösungsmittels zustande, in dem die Polymer-Moleküle gelöst waren. Die Schichtdicke des Polymerfilmes beträgt im gesamten Messbereich etwa 2-10 nm. Damit ist die Dicke der zu analysierenden Filme kleiner als die halbe Anregungswellenlänge und die Anforderung an die Schichtdicke der dünnen Filme für die Untersuchung im Nanoresonator ist dementsprechend erfüllt.

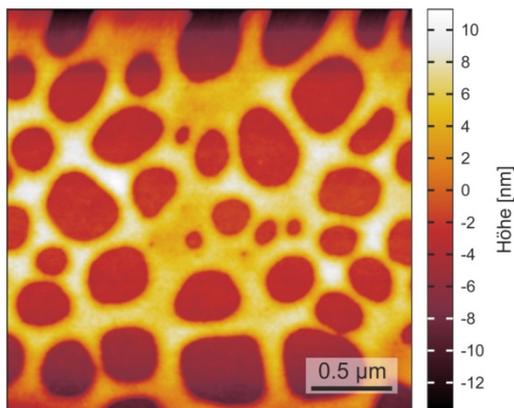


Abb. 73: Exemplarische AFM-Aufnahme der aufgeschleuderten PMMA-Schicht auf einem planaren Silbersubstrat. Die dunklere Fläche ist dabei die Substratoberfläche und die hellere Fläche ist die eigentliche Polymerschicht. Die Dicke des Polymer-Films liegt im Bereich zwischen ca. 2 nm und 10 nm.

Die nachfolgenden Raman-Messungen an Polymerschichten erfolgten in Resonator 1 und Resonator 2. Allerdings konnten an diesen Proben keine Messungen in Abhängigkeit von der Ordnung der Newton'schen Ringe durchgeführt werden, da die räumliche Inhomogenität innerhalb der Schicht zu groß ist. Darüber hinaus ist die Schichtdicke extrem dünn und es wurde nicht an jeder untersuchten Probenposition ein zur Detektion ausreichendes Raman-Signal generiert. Infolgedessen beschränkt sich die Ermittlung der Kavität-induzierten Verstärkung auf Positionen auf dem Ring erster Ordnung innerhalb der Kavität, an denen ein hohes Raman-Signal auftritt.

In Abbildung 74 ist ein exemplarisches Raman-Spektrum von einem PMMA-Film in Resonator 1 und Resonator 2 dargestellt. Jedes der beiden Spektren ergibt sich aus einer Mittelung über 5 Spektren, die an unterschiedlichen Positionen im Maximum erster Ordnung aufgenommen wurden. Anhand der beiden Spektren mit dem subtrahierten Hintergrund wurde die Kavität-induzierte Überhöhung für die stark ausgeprägten Raman-Peaks bei 406 cm^{-1} , 504 cm^{-1} , 1821 cm^{-1} und 2351 cm^{-1} für jeden Peak einzeln bestimmt. Anschließend erfolgte eine Mittelung über diese Werte. Es ist wichtig, einen durchschnittlichen Verstärkungsfaktor anzugeben, denn die Verstärkung ist wellenlängenabhängig. Beispielsweise entspricht der PMMA-Peak bei 406 cm^{-1} einer Wellenlänge von ca. 664 nm, während der Peak bei 2351 cm^{-1} sich bei einer Wellenlänge von ca. 763 nm befindet. Die beiden Raman-Resonanzen liegen ca. 100 nm auseinander und erfahren demzufolge eine unterschiedliche Verstärkung. Unter Berücksichtigung dessen ergibt sich für die PMMA-Schicht eine mittlere Signalverstärkung um den Faktor

1.75 ± 0.03 in Resonator 1 gegenüber der Signalintensität im Resonator 2. Der berechnete Verstärkungsfaktor ist allerdings aufgrund der Inhomogenität der PMMA-Schicht nur bedingt repräsentativ.

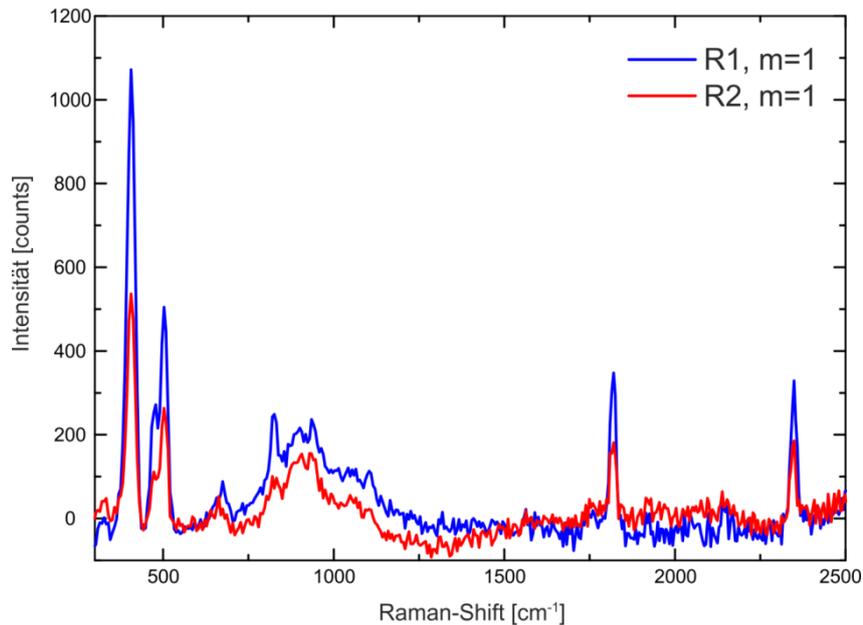


Abb. 74: Vergleich der exemplarischen Raman-Spektren nach der Hintergrundsubtraktion auf dem Ring erster Ordnung $m = 1$ in Resonator 1 (R1, blau) und Resonator 2 (R2, rot). Die Aufnahme erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm, einer fokalen Leistung von 15 mW, einem 40x Trockenobjektiv (NA 0.75) und einer Belichtungszeit von 5 s. Jedes Spektrum stellt eine Akkumulation über 5 Raman-Spektren dar, die an den unterschiedlichen Positionen im Interferenzmaximum erster Ordnung aufgenommen wurden.

Zur Beurteilung der erzielten Überhöhung müssen einige Faktoren berücksichtigt werden. Die nur wenige Nanometer dünne Polymerschicht wurde auf einem unbeschichteten bzw. beschichteten Borosilikat-Substrat mit einer Dicke von $170 \mu\text{m}$ untersucht. Das Substrat weist eine deutlich ausgeprägte Eigenfluoreszenz bei Anregung mit 647 nm auf (vgl. Kap. 3.3). Typischerweise werden hochnumerische Objektive ($NA > 1$) für die Untersuchung von dünnen Schichten eingesetzt. Dadurch wird ein möglichst kleines Anregungsvolumen erreicht und zu einem größeren Teil die Probe statt dem Substrat angeregt. Hier wurde ein Trockenobjektiv mit einer 40-fachen Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 0.75 und somit mit einer im Vergleich zu den oben genannten Objektiven großen Fokausdehnung verwendet. Das führt dazu, dass ein starkes störendes Hintergrundsignal vom verwendeten $170 \mu\text{m}$ dicken BK7-Trägermaterial in der z-Richtung im Laserfokus generiert wird. Bedenkt man die ungleichmäßige Beschichtung des Substrates (s. Abb. 73), so kann man sagen, dass bei einem Bereich der PMMA-Schicht von $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ schätzungsweise maximal 45-50% der Fläche mit dem Polymer bedeckt sind. Damit ist das Anregungsvolumen des Polymers maximal 0.03% des Anregungsvolumens im Substrat. Zu berücksichtigen ist ebenfalls die geringe Transmission des silberbeschichteten Auskoppelspiegels (Resonator 1), die im Bereich

zwischen 650 nm und 750 nm bei ca. 4.9-6.3% liegt (vgl. Abb. 68). Für den unbeschichteten Endspiegel liegt die Transmission bei über 90% (Resonator 2). Unter der Annahme, dass durch die Verwendung einer dichroitischen Beschichtung statt Silber das gesamte Raman-Signal ausgekoppelt wird, wäre der Verstärkungsfaktor 39. Des Weiteren befanden sich die zu untersuchenden Polymer-Proben direkt auf einem Endspiegel des Resonators. Die Knotenpunkte der stehenden elektromagnetischen Felder liegen dabei auf den reflektierenden Flächen, d. h. die Probe befand sich nicht am Ort der maximalen Feldverstärkung (vgl. Abb. 66). Durch eine zusätzliche, transparente und Raman-inaktive Schicht könnte ein Abstand zwischen dem Endspiegel und der Polymerschicht geschaffen werden, so dass die Probe in einem Feldmaximum positioniert wäre.

Durch die Verwendung einer Kavität hoher Güte (Resonator 1) konnte das Raman-Signal von der PMMA-Schicht um einen Faktor von 1.75 ± 0.03 gegenüber einer Referenzkavität geringer Güte (Resonator 2) erhöht werden. Das verwendete PMMA konnte jedoch nicht als homogene Schicht abgeschieden werden. Eine weitere Verstärkung wird somit von homogeneren Molekülschichten erwartet.

Des Weiteren wurden deshalb Lipid-Multilagen in der Nanokavität untersucht. Bei den Lipiden handelt es sich um eine langkettige gesättigte Fettsäure mit der Strukturformel $C_{22}H_{44}O_2$ und einer Länge von ca. 3.3 nm (s. Abb. 75). Diese Carbonsäure ist unter dem Namen n-Docosansäure (oder Behensäure) bekannt und kommt in den Phospholipiden vor [243]. Wie jede Fettsäure ist die Docosansäure amphiphil, d. h. sie besteht aus einem hydrophilen (Carboxylgruppe) und einem hydrophoben (Kohlenwasserstoffketten) Teil.

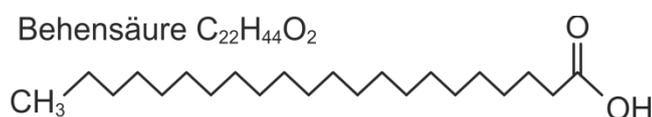


Abb. 75: Chemische Strukturformel der Behensäure $C_{22}H_{44}O_2$, bei der es sich um eine langkettige gesättigte Fettsäure handelt.

Die untersuchten Lipid-Multilagen wurden mit Hilfe eines Langmuir-Blodgett-Troges [244] von Roland Hillmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dario Anselmetti hergestellt. Jeder der analysierten Filme besteht aus 25 Moleküllagen. Ausgehend von der Moleküllänge lässt sich die Filmdicke zu etwa 82 nm abschätzen, was kleiner als die halbe Wellenlänge des Anregungslichts ist.

Die Behensäure liegt als Pulver vor und muss vor dem Übertragen auf ein Substrat durch das Lösen in Chloroform in die flüssige Form überführt werden. Daraufhin werden ca. 50 μ l der Mischung auf die Oberfläche eines mit Wasser gefüllten Langmuir-Blodgett-Troges durch Pipettieren aufgebracht. Nach Verdunstung des Lösungsmittels entsteht eine Monolage der Behensäure auf der Wasseroberfläche (Langmuir-Film). Um intermolekulare Wechselwirkungen zwischen einzelnen Molekülen zu initiieren, wird die Monoschicht mittels einer beweglichen Barriere mit einer

Komprimierungsgeschwindigkeit von $20 \text{ cm}^2/\text{min}$ über die Flüssigkeitsoberfläche zusammengeschoben. Infolgedessen bildet sich eine möglichst dichte Packung des Langmuir-Films aus, so dass ein Übertrag der Monoschicht bei einem Oberflächendruck von 45 mN/m auf ein Substrat stattfinden kann. Beim Transfer wird das Substrat, auf das die Schichten übertragen werden, senkrecht zur Wasseroberfläche durch die komprimierte Monolage in den Trog eingetaucht und wieder herausgezogen [245]. Zu Stabilisierungszwecken erfolgt der Transfer von Lipid-Schichten in Gegenwart von Zinkchlorid-Lösung. Die Übertragungsgeschwindigkeit lag bei der Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten Behensäure-Multilagen bei 10 mm/min .

Es wurde versucht, Raman-Spektren von Lipid-Multilagen in Resonator 1 und Resonator 2 mit einer Anregungswellenlänge von 514 nm und 785 nm aufzunehmen. Allerdings wurde das Signal der Behensäure in beiden Resonator-Systemen von der Autofluoreszenz des jeweiligen Substrats überlagert und somit konnte kein nennenswertes Raman-Signal aufgenommen werden. Lediglich der stärkste Raman-Peak der Behensäure bei 2870 cm^{-1} konnte ansatzweise detektiert werden. Zu den möglichen Ursachen für dieses Verhalten zählen vor allem das geringe Probenvolumen und seine geringere Materialdichte im Anregungsfokus im Vergleich zum Volumen des verwendeten Trägermaterials. Defekte in der Lipid-Multilage, die bei der Übertragung im Langmuir-Blodgett-Trog möglicherweise entstehen könnten, sind ebenfalls nicht auszuschließen. Darüber hinaus ist die Raman-Aktivität der Behensäure nicht sehr hoch und es werden lediglich ca. 2-4% des Raman-Lichts aus dem Resonator 1 ausgekoppelt (vgl. Abb. 68).

Da der am stärksten ausgeprägte Raman-Peak der Behensäure ansatzweise detektiert werden konnte, lässt sich sagen, dass Lipid-Multilagen als potentielle Proben für die Charakterisierung der Verstärkungseffekte in einer Nanokavität in Frage kämen. Ihre Herstellung und langfristige Haltbarkeit sind jedoch aufgrund der schwachen Wechselwirkung der einzelnen Molekülschichten und deren Empfindlichkeit auf Umgebungseinflüsse, wie z. B. Temperatur, Lichteinstrahlung (UV-Licht kann Lipid-Ketten aufbrechen), Luftfeuchtigkeit oder weitere chemische Faktoren stark limitiert [246]. Zusätzlich müsste man voraussichtlich die Schichtdicke der Multilage durch zusätzliche Lagen erhöhen. Dies würde allerdings längere Transferzeiten zur Folge haben. Um den Einfluss des störenden Untergrundsignals zu reduzieren, müssen für zukünftige Experimente solche Substrate, wie Magnesiumfluorid oder Quarz, statt herkömmlicher BK7-Deckgläschen zum Einsatz kommen (vgl. Kap. 3.3).

Im Weiteren wurde das organische Material Graphen untersucht. Eine Einfachlage von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen ist mit einer Schichtdicke unter 1 nm extrem dünn [247], mechanisch stabil [248] und kann auf der Mikrometer-Skala homogen hergestellt werden. Über den Laserfokus hinweg wäre so eine gleichmäßige Schichtdicke gegeben. Aufgrund der Kopplung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung an langreichweitige Phononen wird eine resonante Anregung im Vis- und NIR-Bereich erwartet [96].

Die hier verwendeten Graphen-Monolagen wurden von Dr. Andreas Winter und Emanuel Marschewski aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Armin Gölzhäuser durch Aufheizung auf 1200 K aus vernetzten aromatischen selbstaggregierenden Monolagen hergestellt [249] und für die Raman-Messungen zur Verfügung gestellt.

Jeweils eine Graphen-Schicht wurde auf einem planaren Silbersubstrat (Resonator 1) und auf einem planaren unbeschichteten Substrat (Resonator 2) aufgebracht. Anschließend wurde die Nanokavität mit Hilfe der galvanometrischen Scan-Einheit mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm abgerastert, um die Position der Newton'schen Ringe (vgl. Kap. 4.3.2) zu bestimmen (s. Abb. 76a). Des Weiteren wurden mit Image J exemplarische Intensitätsverteilungen in Abhängigkeit von der Ringordnung um das Zentrum der Kavität bestimmt (s. Abb. 76b). Dabei handelt es sich um eine Intensitätsmittelung entlang der vertikalen Achse für Schnitt 1 und Schnitt 2 (s. Abb. 76a, gelbe Rechtecke). Die beiden Bereiche wurden möglichst klein gewählt, damit die Krümmung der Newton'schen Ringe das gemittelte Intensität im jeweiligen Schnitt nicht beeinflusst.

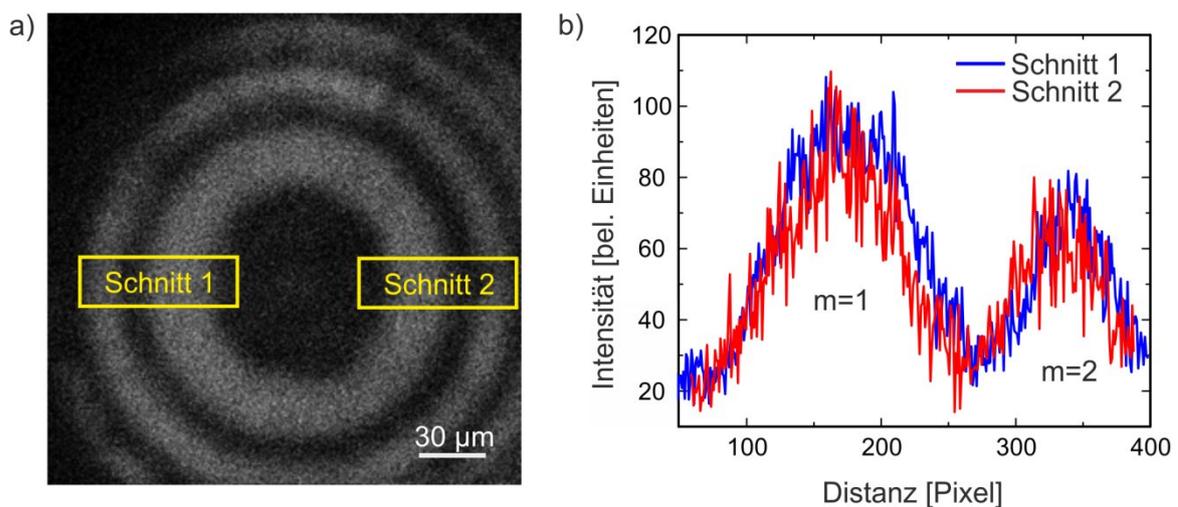


Abb. 76: a) Abbildung der Newton'schen Ringe, die sich innerhalb von Resonator 1 mit der eingeschlossenen Graphen-Monolage ausbilden. Helle Ringe sind Intensitätsmaxima und zeigen Bereiche, in den es zur Feldverstärkung in der Kavität kommt. Entlang der gelben Bereiche wurden Schnittbilder durch die Intensitätsverteilung angefertigt. Die Aufnahme erfolgte durch Abrastern mit einem Laserstrahl ($\lambda_0 = 647$ nm, fokale Leistung von 10 mW), der durch ein 40x Trockenobjektiv (NA 0.75) in die Kavität fokussiert wurde. Die Belichtungszeit beträgt 16 ms pro Scan-Zeile und das Bild ist 1024x1024 Pixel groß. In b) sind die zu Schnitt 1 (blau) und Schnitt 2 (rot) aus a) zugehörigen Intensitätsverteilungen in Abhängigkeit von der Entfernung vom Kontaktpunkt der beiden Spiegel gezeigt, wobei $m = 1$ bzw. $m = 2$ die Ordnung des jeweiligen Intensitätsmaximums bezeichnen. Dabei handelt es sich um eine Intensitätsmittelung entlang der vertikalen Achse.

In Abbildung 76b ist zu erkennen, dass die Peaks, die sich jeweils dem Maximum erster bzw. zweiter Ordnung zuordnen lassen, das erwartete Verhalten hinsichtlich der Intensitätsabnahme mit steigender Ordnung zeigen. Allerdings sind die beiden Peaks im Vergleich zu den Peaks in Abbildung 71b verbreitert und verrauscht. Das lässt sich auf

eine geringe Effizienz der spontanen Raman-Streuung im Vergleich zur Fluoreszenz-Signal zurückführen.

Im Anschluss wurden Raman-Spektren auf dem ersten Newton'schen Ring ($m = 1$) aufgenommen. Die Feldverstärkung ist in diesem Ring am höchsten und dementsprechend wird dort auch die höchste Verstärkung des Raman-Signals erwartet. Zur Bestimmung des Verstärkungseffekts wurde eine Graphen-Monolage sowohl in Resonator 1 als auch in Resonator 2 (Referenz) untersucht. Um den Einfluss der Güte Q der Kavität weiter zu untersuchen, wurde eine Graphen-Monolage auf ein unbeschichtetes planares Substrat übertragen und mit einer konvexen silberbeschichteten Linse abgedeckt (Resonator 3). Dieser Resonator R3 liegt mit einer Güte von $Q(R3) = 0.98$ zwischen dem hoher Güte $Q(R1) = 31$ und $Q(R2) = 0.17$. Die gemessenen Raman-Spektren sind in Abbildung 77 dargestellt.

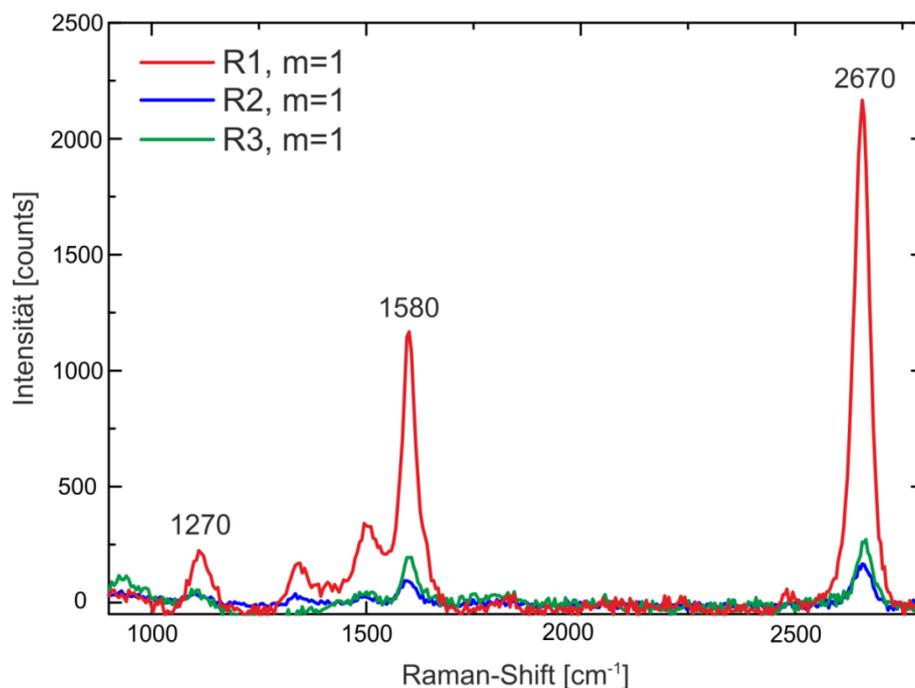


Abb. 77: Exemplarische Raman-Spektren nach dem Hintergrundabzug, aufgenommen auf dem ersten Ring in Resonator 1 (R1, rot), Resonator 2 (R2, blau) und Resonator 3 (R3, grün). Es sind die Raman-Resonanzen von Graphen mit den höchsten Intensitäten eingezeichnet: D-Peak bei 1270 cm^{-1} , G-Peak bei 1580 cm^{-1} und 2D-Peak bei 2670 cm^{-1} . Die Aufnahme erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm, einer fokalen Leistung von 24.1 mW, einem 40x Trockenobjektiv (NA 0.75) und einer Belichtungszeit von 0.5 s. Jedes der hier vorgestellten Spektren stellt eine Mittelung über 3 einzelne Spektren dar, die an den verschiedenen Probenpositionen innerhalb des ersten Newton'schen Ringes aufgenommen wurden.

Wie zu erwarten, wird das schwächste Graphen-Signal in Resonator 2 detektiert (s. Abb. 77, blaue Kurve). Unter Verwendung von Resonator 3 (s. Abb. 77, grüne Kurve) erhöht sich das Raman-Signal von R2 zu R1 um einen Faktor von 1.5 ± 0.1 , der im Wesentlichen auf Rückreflexion des nach vorne gestreuten Signals, sowie des Laserstrahls, zurückzuführen ist (vgl. Kap. 4.3.1). Die Bestimmung des erzielten

Verstärkungsfaktors in der jeweiligen Kavität erfolgt durch den Vergleich der Raman-Peaks bei 1580 cm^{-1} (G-Peak) und 2670 cm^{-1} (2D-Peak) nach der Hintergrundsubtraktion für jeden Peak einzeln. Anschließend wird über diese Werte gemittelt. Wird das Graphen in Resonator 1 untersucht, so nimmt das Raman-Signal stark zu (s. Abb. 77, rote Kurve). Daraus ergibt sich eine mittlere Signalverstärkung um den Faktor 11 ± 0.27 in Resonator 1 gegenüber der Signalintensität im Resonator 2. Die Signalverstärkung in Resonator 1 gegenüber Resonator 3 liefert eine Verstärkung von 5.3 ± 0.22 . Die homogene planare Graphen-Schicht erlaubt einen direkten Vergleich zwischen den Signalamplituden der verschiedenen Resonator-Systeme. Infolgedessen erhält man die höchste Signalerhöhung in Resonator 1, also im Resonator mit silberbeschichteten Grenzflächen.

Bei den in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Experimenten mit Rhodamin B wurde ebenfalls die in Resonator 1 im Vergleich zu Resonator 2 erreichbare Signalverstärkung bestimmt. Sie betrug dort 16 ± 0.17 und ist damit größer als die Verstärkung von Graphen in den gleichen Resonator-Systemen von 11 ± 0.27 . Anhand der durchgeführten Messungen lässt sich allerdings nicht sagen, ob diese Abweichung infolge der unterschiedlichen Wirkungsquerschnitte der beiden Prozesse (der Fluoreszenz und der Raman-Streuung) oder infolge der tatsächlichen Messfehler zustande kommt.

4.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der linearen Abhängigkeit des Raman-Signals von der Konzentration stellt die Analyse von dünnen Schichten mit Schichtdicken von wenigen Nanometern auf wesentlich dickeren Trägermaterialien eine große Herausforderung dar. Demzufolge sind zusätzliche Verstärkungsmechanismen notwendig, um das Raman-Signal von der zu untersuchenden Probe zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde ein Resonator mit einer Güte von $Q = 31$ aus einem silberbeschichteten planaren BK7-Substrat und einer ebenfalls silberbeschichteten konvexen Linse aufgebaut und dessen Funktionsfähigkeit anhand von verschiedenen Dünnschicht-Proben demonstriert. Als Referenz diente ein Resonator aus einem planaren unbeschichteten BK7-Substrat und einer unbeschichteten konvexen Linse mit einer geringen Güte von $Q = 0.17$.

Die Resonatoren weisen ein einfach realisierbares Design auf, das im Vergleich zu planaren Fabry-Perót-Resonatoren, aufgrund des verwendeten konvexen Spiegels, selbststabilisierend ist und demzufolge keiner aufwendigen Justage bedarf. In Bezug auf die Ein- und Auskopplung von Licht benötigt die aufgebaute Nanokavität im Gegensatz zu einem WGM-Resonator keine aufwendigen Einkopplungsoptiken [224]. Im Unterschied zu photonischen Kristallen kann die Kavität außerdem sehr flexibel für verschiedene Anregungswellenlängen, so wie sie im hier verwendeten Raman-System der Fall war, eingesetzt werden.

Erste „Proof-of-Principle“-Messungen mit Resonatoren hoher und geringer Güte erfolgten an einer fluoreszierenden Probe. Das Fluoreszenz-Signal wurde dabei im Resonator hoher Güte um einen Faktor 16 ± 0.17 gegenüber dem Resonator geringer Güte verstärkt. Daraufhin wurde eine PMMA-Schicht analysiert. Diese konnte jedoch nicht als homogene Schicht abgeschieden werden. Die dabei beobachtete Verstärkung von lediglich 1.75 ± 0.03 wird auf die Inhomogenität des Polymerfilmes zurückgeführt. Die untersuchten Lipid-Multilagenn wiesen nur ein geringes Raman-Signal auf, so dass nur der stärkste Raman-Peak detektiert werden konnte. Aufgrund der geringen Signalamplitude konnte jedoch kein Verstärkungsfaktor angegeben werden. Anschließend wurde eine Graphen-Monolage analysiert. Durch die Verwendung der Nanokavität hoher Güte konnte eine Verstärkung des Raman-Signals um einen Faktor 11 ± 0.27 realisiert werden.

Die Effizienz der Nanokavität könnte dabei noch weiter gesteigert werden, indem man beispielsweise ein hochnumerisches Objektiv mit einer größeren Vergrößerung verwenden würde. Durch den lateral als auch axial kleineren Laserfokus ließe sich eine höhere Anregungsdichte erreichen. Des Weiteren könnten komplexere Beschichtungen des planaren Endspiegels gewählt werden, die hohe Reflektivitäten im Anregungsspektrum und hohe Transmittivitäten im Detektionsspektrum aufweisen. Das verstärkte Raman-Signal könnte so effizienter aus der Kavität ausgekoppelt werden. Um den Fluoreszenz-Beitrag des Trägermaterials zu minimieren, sollte in zukünftigen Messungen das Borosilikat-Substrat durch Magnesiumfluorid mit geringerer Autofluoreszenz ersetzt werden (vgl. Kap. 3.3).

In einem Fabry-Pérot-ähnlichen Resonator bilden sich stehende Wellen aus, deren elektromagnetisches Feld auf den spiegelnden Oberflächen die Knotenpunkte bildet, also gleich Null ist (vgl. Kap. 4.3.2). Es wäre also sinnvoll, einen der beiden oder sogar beide Spiegel durch eine transparente Abstandsschicht zu erweitern, welche dafür sorgt, dass die Probe mittig im Feldmaximum des Resonators platziert wird. Dieser Spacer sollte aus einem dünnen, transparenten Material mit einer Raman-Signatur außerhalb vom Fingerabdruck-Bereich ($500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) bestehen, z. B. aus Siliziumoxid.

Solch eine Nanokavität könnte neben der Analyse von Dünnschicht-Systemen auch die Analyse von Partikeln ermöglichen, die kleiner als eine halbe Anregungswellenlänge sind und nur ein schwaches Raman-Signal aufweisen. Zum Beispiel wäre die Untersuchung von ca. 130 nm großen humanen Immundefizienz-Viren in der Nanokavität denkbar [97]. Die Viren können sowohl in unreifer (nicht-infektiöser) als auch reifer (infektiöser) Form vorliegen. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde bereits gezeigt, dass die Reifung der Viren mit ihrer Strukturveränderung einhergeht [250]. Die Trigger für die Umorganisation innerhalb eines Virus und damit für die Virusreifung sind gegenwärtig aber noch nicht eindeutig bestimmt [251]. Von der Gegenüberstellung der Viren-Spektren in den beiden Entwicklungsstadien könnte man auf die begleitenden biochemischen Änderungen schließen. Diese Erkenntnisse wären von Bedeutung für ein besseres Verständnis des Infektionsverlaufs und somit für die Entwicklung eines antiviralen Impfstoffes.

4.4 Wellenlängenabhängigkeit der oberflächenverstärkten Raman-Streuung an Nanopartikel-Dimeren

Im Folgenden wird die Raman-Signalverstärkung durch Nahfeldeffekte an Nanopartikel-Dimeren untersucht. Die beiden Nanopartikel des Dimers werden dabei durch die zu untersuchenden Linker-Moleküle verbunden. Die Stärke des Nahfeldes in solchen Nanopartikel-Systemen kann maßgeblich über die Anregungswellenlänge beeinflusst werden. Das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Raman-Spektrometer ist somit besonders dafür geeignet, dieses System auch multispektral zu untersuchen. Die Verwendung von Nanopartikel-Dimeren zur Raman-Verstärkung ist eine gängige Methode [22], [252]–[254]. Die dabei angewandten Vorgehensweisen, besonders bezüglich der Präparation reiner Dimer-Suspensionen, erschweren jedoch die Interpretation der Messergebnisse. Um einen detaillierteren Einblick in die stattfindenden Verstärkungsmechanismen zu erlangen, wird hier eine alternative Vorgehensweise vorgestellt. In Kapitel 4.4.1 werden die Unterschiede der hier durchgeführten Messungen zu den in der Literatur zu findenden Verfahren erläutert. Daraufhin werden die theoretischen Grundlagen der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie in Kapitel 4.4.2 vorgestellt. Im selben Kapitel wird auch der Begriff des Verstärkungsfaktors eingeführt, der die mittels metallischer Strukturen erreichte Verstärkung im Vergleich zum Signal der spontanen Raman-Spektroskopie angibt. Des Weiteren werden in Kapitel 4.4.3 die Präparation der zu untersuchenden Proben und deren Charakterisierung beschrieben. Die an Dithiol-verbrückten Gold-Dimeren durchgeführten Raman-Messungen werden in Kapitel 4.4.4 vorgestellt und mit numerischen Simulationen in Kapitel 4.4.5 verglichen. Basierend auf den experimentellen und simulierten Daten wird der Verstärkungsfaktor für Moleküle in einem Gold-Dimer-System in Kapitel 4.4.6 berechnet. Anschließend erfolgt in Kapitel 4.4.7 eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

4.4.1 Motivation

Der durchschnittliche Streuquerschnitt der spontanen Raman-Spektroskopie ist sehr gering und liegt mit ca. 10^{-30} cm^2 pro Molekül 14 Größenordnungen unter dem Absorptionsquerschnitt der Fluoreszenz (vgl. Kap. 2.2.3). Aufgrund dessen muss die zu untersuchende Substanz oft in einer hohen Konzentration vorliegen, um für die Detektion ausreichende Raman-Intensitäten zu generieren. Aus diesem Grund wird die Durchführung der spontanen Raman-Spektroskopie zum Beispiel an Substanzen im physiologisch relevanten Konzentrationsbereich in der Bioanalytik deutlich erschwert [11].

Durch den Einsatz von metallischen Nanostrukturen oder Oberflächen mit Rauigkeiten auf der Nanometerskala lässt sich das Raman-Signal um einen Faktor von bis zu 10^{14} verstärken [255]. Diese Verstärkung rührt von der lokalen Erhöhung der elektromagnetischen Feldes in der Umgebung von Edelmetallen her [252]. Infolge der Anregung (zum Beispiel durch Lichteinstrahlung) werden die freien Leitungselektronen im Metall zu kollektiven Schwingungen angeregt, die als Oberflächenplasmonen (engl. *Surface Plasmon, SP*) bezeichnet werden. Die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung muss dabei in ihrer Frequenz und ihrem Wellenvektor an die Plasmonenresonanz angepasst sein, um eine SP-Oszillation zu initiieren.

Im Fall von Nanostrukturen lässt sich die spektrale Lage dieser SP-Resonanz zum Beispiel durch die Größe, Form und Umgebung der verwendeten Nanopartikel (NP) beeinflussen [256]. Nach der Lichtabsorption kommt es aufgrund der nicht-kompensierten Oberflächenladungen in NP zu einer Überhöhung des evaneszenten elektromagnetischen Feldes auf der Metalloberfläche. Eine besonders signifikante Feldverstärkung wird in sogenannten „Hot Spots“ beobachtet. In einem Dimer, das aus zwei NP besteht, befindet sich beispielweise ein solcher „Hot Spot“ in der Lücke zwischen den beiden NP. Diese wird im Folgenden als Gap bezeichnet. Die Größe der NP, deren Abstand zueinander und Ausrichtung zum anregenden Lichtfeld bestimmen dabei das Maß der Feldüberhöhung. Befindet sich ein Analyt-Molekül in solch einer Nahfeldumgebung, so wird sein Raman-Signal durch die Wechselwirkung mit dem Nahfeld erhöht. Diese Methode wird dementsprechend oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (engl. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS*) genannt. Im Vergleich zur spontanen Raman-Spektroskopie lässt sich mit SERS eine deutlich höhere Sensitivität erreichen, die die Detektion von niedrigen Molekülkonzentrationen bis zum Einzelmolekül ermöglicht [12], [257].

In folgenden Messungen wurde der SERS-Ansatz verfolgt, um das spektroskopische Verhalten von Gold-Nanopartikel-Aggregaten in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge systematisch zu untersuchen. Gold-Nanopartikel (Au-NP) zeichnen sich sowohl durch ihre chemische Langzeitstabilität als auch durch ihre einfache und reproduzierbare Herstellung aus. Aufgrund dessen sind sie für bioanalytische und nanoplasmonische Anwendungen von großem Interesse. Die Anregungsresonanzen der meisten metallischen NP liegen im UV-Bereich, während sich die von NP aus Gold, Silber und Kupfer im sichtbaren Spektralbereich befinden [258]. Da für diesen Bereich eine große Bandbreite lasergestützter Methoden zur Verfügung steht, eröffnen die Nanostrukturen aus den oben genannten Metallen eine Vielzahl von Anwendungen [12], [254], [259], [260]. Unter Berücksichtigung seiner geringen chemischen Reaktivität wird Gold trotz der geringeren Nahfeldverstärkung im Vergleich zu beispielsweise Silber bevorzugt.

Die hier verwendeten NP-Dimere bestehen aus zwei sphärischen Au-NP, welche durch Anbindung von organischen Linker-Molekülen mit zwei Thiol-Endgruppen, Dithiolen, gebildet werden. Dimere sind die einfachsten Strukturen („Modellsysteme“) zur

Untersuchung von gekoppelten plasmonischen Resonanzen. Im Vergleich zu den Resonanzen einzelner NP wird eine größere Überhöhung des lokalen elektromagnetischen Feldes in der Lücke zwischen den beiden NP infolge der Hybridisierung einzelner Plasmonenresonanzen hervorgerufen [261]. Ähnlich zu isolierten NP hängt die spektrale Lage der Plasmonenresonanz eines Dimers von der Größe der beiden NP, deren Material und Umgebung ab. Zusätzlich lässt sie sich durch den Partikelabstand der NP relativ zueinander beeinflussen. Durch die Variation der Synthese-Bedingungen kann die Länge des Linker-Moleküls verändert werden. Damit wird gleichzeitig der Abstand der NP zueinander eingestellt und somit die Plasmonenresonanz bei Bedarf angepasst.

In der aktuellen Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele von SERS-Messungen an fraktionierten NP-Dimeren sowohl in Lösung als auch auf der Oberfläche finden [25], [262]. Unter Fraktionierung versteht man unterschiedliche Verfahrensschritte (z. B. Ultrazentrifugation oder Membranfiltration), die zur Auftrennung der NP in Abhängigkeit von ihrer Größe führen [27]. Neben der beabsichtigten NP-Separation können die Trennungsprozesse allerdings die unerwünschte Desorption gebundener Linker-Moleküle zur Folge haben. Des Weiteren findet im Laufe der Fraktionierung ebenfalls ein Mediumaustausch statt, der zur Entfernung von nicht-gebundenen Molekülen aus der Dispersion führt. Infolgedessen lassen sich auch die Anzahl der Moleküle in der Analyt-Lösung, der Bedeckungsgrad der NP und damit auch der Verstärkungsfaktor¹⁰ nicht abschätzen. Der entscheidende Unterschied zu bereits publizierten Ergebnissen und dieser Arbeit besteht darin, dass die analysierte Lösung nicht fraktioniert und nicht aufgereinigt wurde, d. h. in der zu untersuchenden Probe befinden sich neben den Dimeren auch andere Nanostrukturen (Monomere, Trimere und Aggregate höherer Ordnung), aber auch ungebundene Moleküle, die ebenfalls zur Erzeugung des Raman-Signals beitragen. Aufgrund dessen können sowohl der Bedeckungsgrad der NP als auch die Anzahl der Moleküle in der Lösung genau berechnet werden. Mit Hilfe von sechs verschiedenen Anregungswellenlängen im Vis- und NIR-Bereich wurde das resonante und nicht-resonante Verhalten der Dimere in Anwesenheit anderer Aggregate eingehend untersucht.

In der SERS-Literatur lassen sich häufig enorme Verstärkungsfaktoren bis zu 10^{14} finden, die im Gap zwischen zwei NP detektiert wurden [263], [264]. Die Anzahl der tatsächlich an der Verstärkung partizipierenden Moleküle wird dabei sehr kontrovers diskutiert [255], [263]. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ebenfalls die Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors für das untersuchte Dimer-System. Im Unterschied zu den bereits veröffentlichten Publikationen wurden bei den Berechnungen in dieser Arbeit jedoch neben den Molekülen zwischen den beiden NP auch die Moleküle auf der gesamten NP-Oberfläche und ungebundene Moleküle in Lösung berücksichtigt. Sie tragen ebenso zum

¹⁰ Der Verstärkungsfaktor gibt an, um wie viel stärker das Raman-Signal des Analyten in Anwesenheit der NP im Vergleich zum Raman-Signal des Analyten ohne Einsatz der NP ist.

gemessenen Raman-Signal bei und müssen daher in Betracht gezogen werden, wenn man den Verstärkungsfaktor korrekt bestimmen möchte.

4.4.2 SERS-Grundlagen und Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors

In den 70er-Jahren publizierte die Gruppe um M. Fleischmann Raman-Spektren, die von einer Monolage adsorbierter Pyridin-Moleküle auf elektrochemisch angerauten Silberelektroden aufgenommen wurden, und berichtete vom beobachteten Verstärkungseffekt, den sie zu dem Zeitpunkt allerdings nicht erklären konnten [265]. Drei Jahre später haben R. Van Duyne und D. Jeanmarie und M. Albrecht und J. Creighton unabhängig voneinander gezeigt, dass das Raman-Signal von auf Edelmetallen adsorbierten Substanzen im Vergleich zu nicht-adsorbierten 10^5 - 10^6 mal stärker ist [266], [267].

Das waren die ersten Nachweise der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie. Heutzutage ist der SERS-Mechanismus immer noch ein Gegenstand intensiver Forschung. Dies spiegelt sich auch in der zunehmenden Zahl an Publikationen auf diesem Gebiet wider: Zwischen 1977 und 1998 wurden ca. 2500 SERS-bezogene Artikel veröffentlicht, allein im Jahre 2011 waren es schon 1400 Abhandlungen [263].

Die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie verbindet die Vorteile der konventionellen (spontanen) Raman-Spektroskopie mit der durch Metallstrukturen erhöhten Empfindlichkeit bis hin zum Einzelmolekül-Nachweis. Die Zunahme der Sensitivität wird in Abbildung 78 anhand der Gegenüberstellung zweier Spektren von Rhodamin 6G in Wasser veranschaulicht. Das eine Spektrum wurde dabei an einem Farbstoff-Molekül in Anwesenheit von Silber-NP mittels SERS (s. Abb. 78a) und das andere an $7.8 \cdot 10^5$ Farbstoff-Molekülen ohne NP mittels der spontanen Raman-Spektroskopie (s. Abb. 78b) aufgenommen. Der Vergleich der beiden Spektren ergab einen Verstärkungsfaktor von $7.3 \cdot 10^9$, um den das SERS-Signal stärker als das Raman-Signal ohne NP ist.

Darüber hinaus sind mit SERS trotz geringerer Konzentrationen deutlich kürzere Belichtungszeiten realisierbar: Es wird eine Belichtungszeit von lediglich 0.05 s benötigt, um ein definiertes SERS-Spektrum von Rhodamin 6G aufzunehmen (s. Abb. 78a), während im Fall der spontanen Raman-Spektroskopie auch eine Belichtungszeit von 400 s zu keinem ausgeprägten Raman-Spektrum führt (s. Abb. 78b).

Somit lassen sich mit SERS sehr kleine Analytmengen untersuchen. Dies spielt eine wichtige Rolle beispielsweise bei der Detektion von Biomolekülen, wie Proteinen oder DNA, die *in situ* oft in sehr kleinen Konzentrationen vorliegen [11], [268], [269].

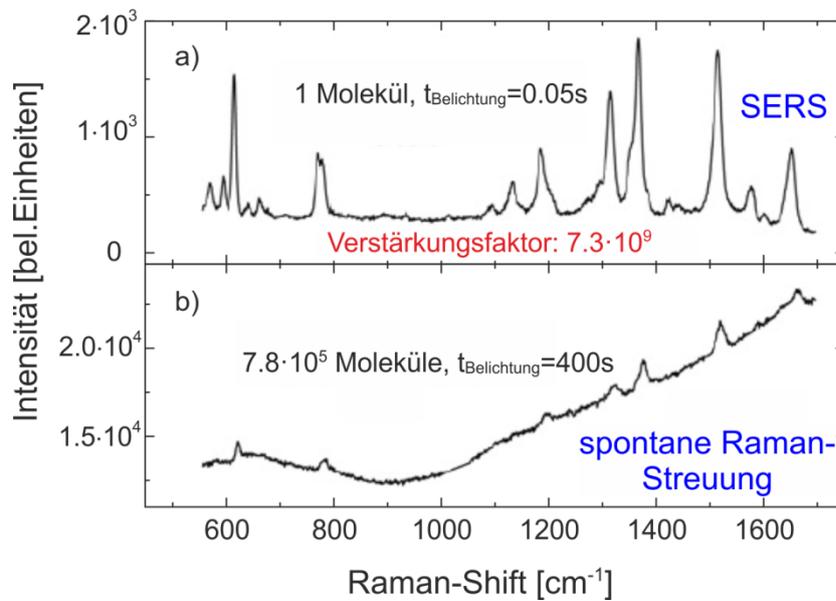


Abb. 78: a) SERS-Spektrum, aufgenommen an einem einzelnen Farbstoffmolekül Rhodamin 6G in der Nahfeldumgebung von Silber-NP (Belichtungszeit: 0.05 s). b) konventionelles Raman-Spektrum von Rhodamin 6G in Wasser (100 μM -Lösung, ca. $7.8 \cdot 10^5$ Moleküle im Anregungsfokus, Belichtungszeit 400 s). Bis auf unterschiedliche Farbstoff-Konzentrationen wurden die beiden Spektren unter gleichen Bedingungen mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm, einer Leistung von 3 mW und einem 100x Ölimmersionsobjektiv aufgenommen. Während das SERS-Spektrum definiert ist und mehrere Peaks unterschiedlicher Intensität aufweist, lassen sich im „klassischen“ Raman-Spektrum nur die Raman-Resonanzen mit den höchsten Intensitäten detektieren. Die übrigen Peaks werden durch den fluoreszenten Untergrund verdeckt (adaptiert aus [23]).

Zu den weiteren Vorteilen von SERS gehört auch die Möglichkeit, diese Technik mit anderen analytischen Methoden zu kombinieren, z. B. mit der Mikrofluidik [260], [270]. Ferner kann man auch die Ortsauflösung der Raman-Spektroskopie durch die Ausnutzung der chemischen Spezifität von SERS bis in den Nanometer-Bereich erhöhen. Dazu wird die hohe räumliche Auflösung eines Rasterkraftmikroskops und dessen nur wenige Nanometer dünne Spitze mit einem Raman-Mikroskop kombiniert. Je nach der Abmessung der verwendeten AFM-Spitze ist eine laterale Auflösung von unter 1 nm erreichbar, die somit deutlich unter dem Beugungslimit liegt [271], [272]. Während die metallische AFM-Spitze mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt gebracht wird, erfolgt deren Beleuchtung mit einem Anregungslaser. Infolge der Nahfeldüberhöhung an der AFM-Spitze kann ein erhöhtes Raman-Signal von Substanzen in deren unmittelbaren Umgebung detektiert werden. Das beschriebene Verfahren wird als spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie (engl. *Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*, *TERS*) bezeichnet und ermöglicht die Untersuchung sowohl von biologischen (z. B. einzelnen Viren oder DNA) als auch von nicht-biologischen (z. B. Kohlenstoff-Nanoröhrchen oder Halbleitermaterialien) Proben [273], [274], [41].

Die Entdeckung des SERS-Effekts liegt mittlerweile ca. 40 Jahre zurück und ist ein zentraler Aspekt zahlreicher Publikationen aus verschiedensten Bereichen (Medizin,

Forensik, analytische Chemie etc.) [12], [254], [275]. Dennoch werden die dem SERS-Effekt zugrundeliegenden physikalischen Mechanismen immer noch sehr kontrovers diskutiert [23], [263]. Als dominierender Verstärkungsmechanismus wird die lokale plasmoninduzierte Nahfeldüberhöhung angesehen. Dahingegen sind Einflüsse von chemischen Mechanismen auf die SERS-Gesamtverstärkung umstritten. Die Nahfeldverstärkungseffekte und die Einflüsse der chemischen Verstärkung werden im Folgenden vorgestellt.

Der plasmoninduzierte Nahfeld-Verstärkungsmechanismus

Metalle bestehen aus positiv geladenen Atomrümpfen und negativ geladenen Elektronen, wobei letztere im metallischen Festkörper frei beweglich sind. Diese quasi-freien Leitungselektronen in plasmonisch aktiven Metallen (z. B. Gold oder Silber) lassen sich entweder durch elektromagnetische Strahlung oder energiereiche Elektronenstöße zur Auslenkung gegenüber den Atomrümpfen anregen. Das mit den SP einhergehende evaneszente Feld hat sein Maximum an der Luft-Metall-Grenzfläche und zeigt senkrecht dazu ein exponentielles Abklingverhalten mit zunehmendem Abstand in beide Richtungen von der Grenzfläche, wobei die Reichweite des evaneszenten Feldes von bis zu 10 nm beträgt [276]. Das bedeutet, dass die Plasmonenenergie auf der Oberfläche lokalisiert ist [23].

Prinzipiell lassen sich SP in sämtlichen Metallen anregen, allerdings nur durch Beschuss mit schnellen Elektronen (1-10 keV) beispielsweise in einem Transmissionselektronenmikroskop [277], [278]. Die optische SP-Anregung im Vis- und NIR-Bereich ist nur bedingt möglich und kann nur in wenigen Metallen, wie z. B. Silber, Gold, Kupfer oder Platin, erfolgen [23]. Da die Dispersionsrelationen der SP und des eingestrahnten Lichts im Dielektrikum (Luft oder Vakuum) keinen gemeinsamen Schnittpunkt besitzen, können die SP an einer Dielektrikum-Metall-Grenze mit elektromagnetischer Strahlung nicht direkt angeregt werden. Die Energie- und Impulserhaltung können in diesem Fall nicht gleichzeitig erfüllt werden. An planaren Oberflächen erfolgt die Plasmonenerzeugung unter den folgenden Bedingungen: Der einfallende Lichtimpuls (transversale Welle) muss unter Berücksichtigung der Energie- und Impulserhaltung mit dem Impuls des induzierten Plasmons (longitudinale Welle) koppeln. Der Wellenvektor des einfallenden Lichts ist für eine direkte Anregung jedoch zu klein. Um trotzdem eine Kopplung zu erreichen, wird zum Beispiel ein wenige Nanometer dünner Metallfilm auf einem Prisma abgeschieden und unter einem variablen Winkel beleuchtet (Kretschmann-Konfiguration). Der auf die Metalloberfläche projizierte Wellenvektor des Lichtes entspricht dann dem eines SP, wodurch Plasmonen angeregt werden können [279]. Alternativ kann die Kopplung der beiden Wellenvektoren durch Oberflächenrauigkeiten des planaren metallischen Films auf der Nanometer-Skala erreicht werden [23].

Erst durch die Verwendung von NP wird eine direkte Ankopplung des Wellenvektors elektromagnetischer Strahlung an den Wellenvektor des Plasmons des NP erzielt. In erster Linie geschieht dies aufgrund der geringen Dimensionen der Nanostrukturen, die kleiner als die Anregungswellenlänge und die Eindringtiefe des Lichts sind. Infolgedessen lassen sich SP in NP auch ohne zusätzliche Anordnungen optisch anregen.

Neben den bereits genannten Unterschieden hinsichtlich der optischen Plasmonenanregung gibt es noch eine weitere Abgrenzung zwischen SP auf einer planaren metallischen Oberfläche und SP eines NP. Im Fall von ausgedehnten Metalloberflächen ist eine Ausbreitung der SP entlang der Grenzfläche möglich (s. Abb. 79a). Somit können von den SP Strecken im Metall bis zu 100 μm zurückgelegt werden [280], wobei die Distanz durch interne Dämpfungsmechanismen limitiert ist: Infolge von Elektron-Elektron-Streuprozessen kommt es zur Überführung der Plasmonenschwingungsenergie in Wärme und die Propagation der SP wird gedämpft. Im Fall von metallischen NP spricht man von lokalisierten Oberflächenplasmonen oder Partikelplasmonen, da deren Ausbreitung durch die Nanostruktur räumlich begrenzt ist (s. Abb. 79b). Der Unterschied zwischen propagierenden und lokalisierten Oberflächenplasmonen ist schematisch in Abbildung 79 gezeigt.

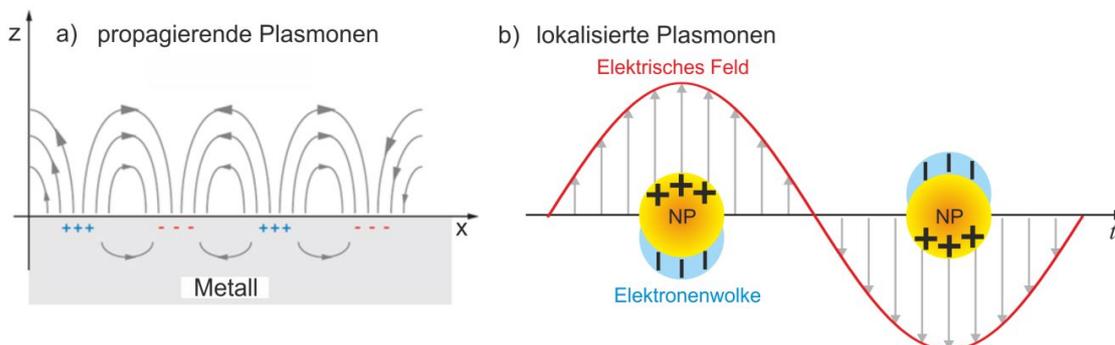


Abb. 79: Schematische Darstellung von Oberflächenplasmonen. Im Fall von propagierenden Oberflächenplasmonen (a) erfolgt eine Ausbreitung in x- und y-Richtung entlang der Dielektrikum-Metall-Grenzfläche. Dabei wechseln sich die Bereiche mit positiver und negativer Ladungsdichte ab. In Abhängigkeit vom Material kann ein SP Strecken von etwa 10 μm bis 100 μm auf der Metalloberfläche zurücklegen. In z-Richtung lässt sich dagegen ein exponentieller Abfall des elektromagnetischen Feldes beobachten. b) Bei der Wechselwirkung von Licht mit metallischen Nanopartikeln, deren Abmessungen kleiner als die verwendete Wellenlänge sind, oszillieren die Oberflächenplasmonen um das Nanopartikel und sind somit lokalisiert (adaptiert aus [280]).

In dieser Arbeit werden ausschließlich NP und somit lokalisierte SP betrachtet. Deren Anregung mit elektromagnetischer Strahlung hat kollektive periodische Schwingungen des Elektronengases zur Folge, wobei die Schwingungsfrequenz mit der anregenden Frequenz übereinstimmt. Solch ein oszillierendes System kann als Hertz'scher Dipol angesehen werden, der seine Energie in Form von Licht abgestrahlt. Dabei hängt die spektrale Lage der Plasmonenresonanz sowohl von den intrinsischen Eigenschaften der verwendeten Nanostrukturen (Form, Größe, Material) als auch von deren Umgebung ab.

Neben der fundamentalen Dipolmode (s. Abb. 80a) treten bei asymmetrischen oder größeren Nanopartikeln Resonanzen höherer Ordnung (z. B. Quadrupol- und Oktupolmoden) auf (s. Abb. 80b) [281].

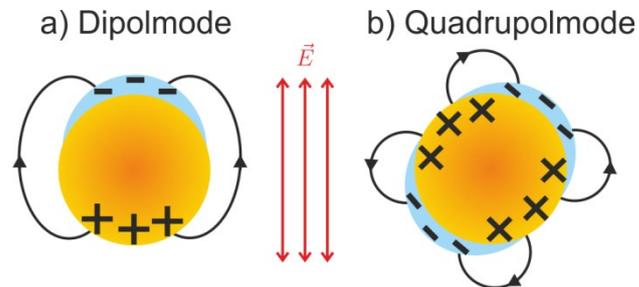


Abb. 80: Schematische Darstellung einer Dipolmode (a) und Quadrupolmode (b) mit dazugehöriger Elektronenverteilung. Die Quadrupolmode lässt sich leichter bei asymmetrischen oder größeren Partikeln anregen. Die Polarisation des elektromagnetischen Feldes ist mit roten Pfeilen angedeutet.

Die Übereinstimmung der Anregungswellenlänge mit der Plasmonenresonanz hat eine signifikante lokale Überhöhung des elektromagnetischen Feldes zur Folge. Dies führt zur deutlichen Verstärkung des SERS-Signals im Vergleich zum nicht-oberflächenverstärkten Raman-Signal [22]. Dieses Verhalten ist durch die Abhängigkeit der Signalintensität von der Feldstärke bedingt: Während die Intensität der spontanen Raman-Streuung linear mit der Intensität der einfallenden Welle skaliert und demzufolge eine quadratische Proportionalität vom elektromagnetischen Feld aufweist [282], ist die SERS-Intensität proportional zu $|E|^4$ [283]. Dieser Faktor resultiert jeweilig aus der $|E|^2$ -Abhängigkeit der beiden am Streuprozess beteiligten elektromagnetischen Felder: des (Raman-) Streufeldes und des einfallenden Feldes.

Um eine weitere Signalverstärkung durch plasmonische Nahfelder zu erzielen, bringt man zwei NP so nahe zusammen, dass diese beginnen zu wechselwirken und ein Dimer bilden. Die typischen Abstände zwischen den beiden NP liegen im Bereich von wenigen Nanometern [284]. Aufgrund der Hybridisierung der Plasmonenresonanzen einzelner NP im Gap werden die Rotverschiebung der resultierenden Plasmonenresonanz und die signifikante Nahfeldverstärkung im Partikel-Gap hervorgerufen. Dadurch kommt es zur Verstärkung des Raman-Signals von zu untersuchenden Molekülen zwischen den beiden NP.

Wird der Abstand noch weiter verringert (< 0.31 nm), so treten quantenmechanische Effekte auf (s. Abb. 81) [285]. Die Elektronen tunneln zwischen den Partikeln, wodurch es zur Umverteilung der Ladungen der beiden NP und zu einer Verringerung des SERS-Signals kommt (vgl. Kap. 4.4.6). Aufgrund dessen lassen sich die Eigenschaften von Dimeren mit so geringen Abständen nur sehr schwer kontrollieren. Demzufolge eignen sich Dimere mit einem subnanometergroßen Partikelabstand nur begrenzt für SERS-Anwendungen [286]–[288]. Bei höheren Laserleistungen kann das Tunneln allerdings

bereits bei größeren Partikelabständen einsetzen, z. B. bei einer Leistung von 10^9 W/cm^2 tritt es auch schon bei einem Abstand von 1 nm auf [289].

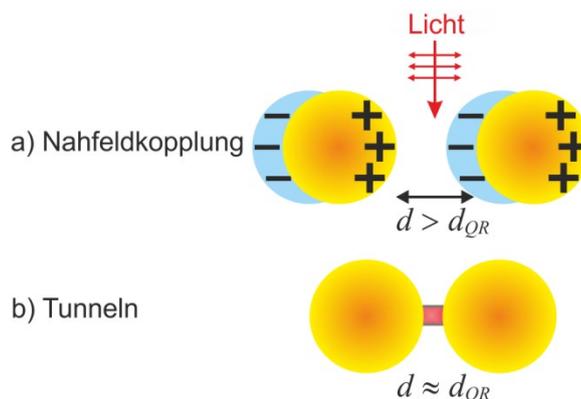


Abb. 81: Schematische Darstellung eines Dimers mit unterschiedlichen Partikelabständen. d_{QR} ist der kritische Partikelabstand von 0.31 nm. a) Bei einem Partikelabstand $d > d_{QR}$ findet die Plasmonenkopplung nach dem klassischen Modell statt, wobei d wenige Nanometer beträgt. In b) ist der Fall gezeigt, bei dem d_{QR} unterschritten und somit quantenmechanisches Tunneln zwischen den beiden metallischen Oberflächen (roter Streifen) ermöglicht wird (adaptiert aus [285]).

Der chemische Verstärkungsmechanismus

Folgt man der Argumentation bezüglich der Raman-Verstärkung aufgrund einer elektromagnetischen Feldüberhöhung, so müssten alle Analyten ein erhöhtes Raman-Signal zeigen. Es gibt aber durchaus Substanzen, wie z. B. Ethanol, die keine detektierbare SERS-Verstärkung aufweisen [290].

Des Weiteren würde man einen identischen Verstärkungsfaktor für zwei unterschiedliche Analyten mit vergleichbaren Raman-Streuquerschnitten auf gleichen Metalloberflächen erwarten [291], [292]. Dies ist aber nicht der Fall. Beispielsweise haben Qian et. al anhand der organischen Verbindungen Malachitgrün und Malachitgrün-Isothiocyanat gezeigt, dass sich die Verstärkungsfaktoren für beide Analyten unter ansonsten gleichen Bedingungen um einen Faktor von 200 unterscheiden [293]. Dies legt den Schluss nahe, dass die SERS-Verstärkung analytabhängig ist. Es wird daher vermutet, dass die Verstärkung auch auf einen chemischen Effekt zurückzuführen ist [10].

Die sogenannte chemische Verstärkung beruht vor allem auf dem Ladungstransfer zwischen der metallischen Oberfläche und einem darauf chemisorbierten Molekül. Dieser Ladungstransfer kann entweder durch den Übergang eines Elektrons aus dem Metall zum Molekül oder umgekehrt erfolgen. Dies hat die Veränderung der molekularen Polarisierbarkeit und eine daraus resultierende Raman-Signalerhöhung zur Folge (vgl. Kap. 2.4). Beim chemischen Verstärkungsmechanismus handelt es sich um einen sogenannten „First-Layer“-Effekt, d. h. nur die oberste chemisorbierte Molekülschicht ist in den stattfindenden Ladungstransfer und somit in die Verstärkung involviert. Infolgedessen hat der Effekt eine geringe Reichweite von 1-2 nm [23]. Es wird außerdem davon ausgegangen, dass die chemische Verstärkung im Vergleich zum

elektromagnetischen Mechanismus nur einen kleinen Beitrag zur Gesamtverstärkung von bis zu 10^2 - 10^3 liefert [22], [294]. Aufgrund immer noch ungeklärter Fragen werden dieser Effekt und sein Beitrag zur Gesamtverstärkung kontrovers diskutiert [263].

Bestimmung des Verstärkungsfaktors

Aufgrund der Tatsache, dass der Beitrag der chemischen Verstärkung immer noch umstritten ist, geht man davon aus, dass der elektromagnetische Nahfeld-Effekt den Hauptbeitrag zur gesamten SERS-Verstärkung liefert. Die chemische Verstärkung wird deshalb im Folgenden vernachlässigt. Die SERS-Gesamtverstärkung wird häufig in Form des sogenannten Verstärkungsfaktors EF (engl. *Enhancement Factor*, EF) angegeben, wodurch auch eine Vergleichbarkeit zu SERS-Messungen in der Literatur hergestellt wird:

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{SERS}}{I_{RS}/N_{RS}} \quad (4.5)$$

Dabei ist I_{SERS} die Intensität des oberflächenverstärkten Raman-Signals und I_{RS} die Intensität des nicht-oberflächenverstärkten Raman-Signals. N_{SERS} gibt die Anzahl der auf dem SERS-Substrat adsorbierten Moleküle an, während N_{RS} der Anzahl der Raman-aktiven Moleküle im Streuvolumen entspricht.

Hierbei ist zwischen dem durchschnittlichen und maximalen Verstärkungsfaktor zu unterscheiden. Bei einer homogenen Probe ist der durchschnittliche Verstärkungsfaktor $\langle EF \rangle$ mit einer geringen Standardabweichung an jeder Position der Probe messbar und liegt typischerweise in einem Bereich von $\langle EF \rangle \approx 10$ - 10^3 [23]. In einer besonders SERS-aktiven Umgebung lassen sich durchschnittliche Faktoren von bis zu $\langle EF \rangle \approx 10^4$ - 10^6 beobachten [295]. Der maximale Verstärkungsfaktor EF_{Max} hingegen kann in einigen Systemen bis zu $EF_{Max} \approx 10^{14}$ betragen, wird aber nur in bestimmten Regionen der zu untersuchenden Probe detektiert [264]. Das können zum Beispiel Nahfeldüberhöhungen im Gap eines metallischen NP-Dimers sein. In Abbildung 82 wird dieses Verhalten anhand der simulierten Feldüberhöhung in einem Au-NP-Dimer verdeutlicht. Für die Simulationen wurde eine Finite-Elemente-Methode verwendet und eine elektrostatische Näherung angenommen. Das Dimer wurde mit einer Wellenlänge von 559 nm beleuchtet, wobei das Laserlicht entlang der Dimer-Achse polarisiert ist.

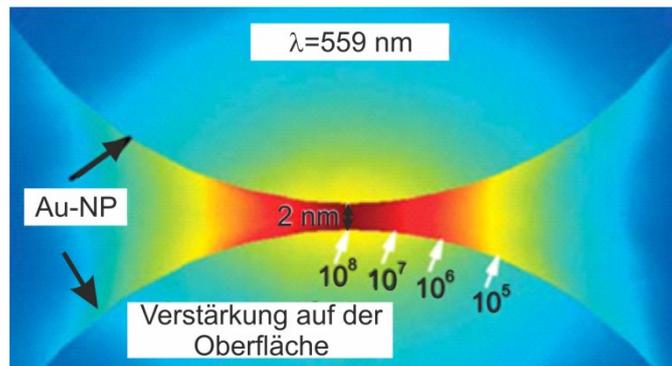


Abb. 82: Berechnete Nahfeldverstärkung in einem Au-NP-Dimer in Abhängigkeit von der Position im Gap zwischen den NP. Die Anregung erfolgt mit 559 nm. Die Polarisation des Anregungslichtes ist parallel zur Dimer-Achse ausgerichtet. Der Radius der Au-NP beträgt $r = 30$ nm und der Partikelabstand $d = 2$ nm. Die Bereiche niedriger Feldverstärkung sind in blau und die Bereiche hoher Feldverstärkung in rot dargestellt. Der Verstärkungsfaktor EF_{Max} variiert auf der Distanz von 2-4 nm von 10^8 (direkt im Gap) bis 10^5 (nach außen hin) (adaptiert aus [254]).

Unmittelbar im Gap zwischen den beiden Au-NP beträgt der durch die Simulationen berechnete Verstärkungsfaktor $EF_{Max} = 10^8$ und nimmt nach außen hin auf einer Distanz von 2-4 nm bis auf 10^5 ab. Näherungsweise kann ein Dithiol-Molekül (vgl. Kap. 4.4.1) als einen Stab mit einem Durchmesser von 0.15 nm und einer berechneten Länge von 3.1 nm vorgestellt werden [296]. Der letzte Wert beruht auf der Berechnung der Schwefel-Schwefel-Länge, die sich aus der Summe der Bindungslängen für Kohlenstoff-Kohlenstoff- und Schwefel-Kohlenstoff-Bindungen ergibt. Nimmt man an, dass sich die Moleküle mit ihrer Längsachse parallel zur Dimer-Achse im Gap anordnen, so entspricht die Distanz von 2-4 nm etwa 13-27 dicht nebeneinander angeordneten Dithiolen. In Abhängigkeit von ihrer Position im Gap erfahren diese Dithiole jeweils eine andere Nahfeldverstärkung, die sich im konkreten Fall bis zu 3 Größenordnungen unterscheidet. Infolgedessen muss das beschriebene Verhalten bei der Bestimmung der EF berücksichtigt werden.

Bei der Gegenüberstellung der berechneten EF und der sich in der Fachliteratur findenden EF muss des Weiteren auch Folgendes beachtet werden: Der EF ist charakteristisch sowohl für verschiedene metallische Oberflächen als auch für unterschiedliche Streuquerschnitte. Der Streuquerschnitt ist dabei stark wellenlängenabhängig [263]. Dementsprechend müssen für einen Vergleich EF die oben genannten Parameter identisch sein.

4.4.3 Probenpräparation und Charakterisierung

Im Folgenden wird die Präparation der verwendeten Au-NP-Dispersionen beschrieben. Daraufhin erfolgt die Charakterisierung dieser Dispersionen in Bezug auf ihre Homogenität und chemische Langzeitstabilität mittels der Transmissionselektronenmikroskopie und der Absorptionsspektroskopie.

Probenpräparation und Abschätzung der Beladungsdichte pro NP

Die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Au-NP wurden durch Reduktion einer Tetrachlorogoldsäure mittels Natriumcitrat im wässrigen Medium hergestellt (Perrault-Methode) [297]. Durch die beschriebene chemische Reaktion entsteht eine Lösung mit zahlreichen reduzierten Au-Atomen, die sich durch die sogenannte Keimbildung zu größeren Clustern, Nanopartikeln, zusammenlagern. Die Kontrolle der Partikelgröße erfolgt dabei über die Anpassung des Verhältnisses der Edukte. Mit einem Transmissionselektronenmikroskop wurde ein durchschnittlicher Durchmesser der Au-NP zu 38 ± 7 nm bestimmt, somit ist die im Herstellungsprozess auftretende Heterogenität der NP gering. Infolgedessen wurden die synthetisierten NP für die Experimente weder aufgereinigt noch fraktioniert. Um eine Agglomeration der NP im Laufe der Zeit zu verhindern, lassen sich beispielsweise zusätzliche Oberflächenladungen anbringen. Dazu werden Citrat-Ionen eingesetzt, die eine stabilisierende Hülle um jedes NP bilden. Beim Aufeinandertreffen zweier Citrat-stabilisierten NP kommt es aufgrund der gleichen Oberflächenladung zur elektrostatischen Abstoßung und somit wird deren unerwünschte Koagulation vermieden [298].

Es werden nachfolgend sowohl Au-NP-Dimere (Dimer-Dispersion) als auch einzelne Au-NP (Monomer-Dispersion) zur Untersuchung des SERS-Effekts eingesetzt, wobei die Monomer-Dispersion als Referenzprobe dient. Beide Dispersionen entstehen durch Inkubation von Au-NP und Analytmolekülen, die eine stäbchenähnliche Form haben und vier Alkin-Gruppen (Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindungen) enthalten. Im Fall der Dimere tragen diese Moleküle, Dithiole, zwei Thiol-Endgruppen (s. Abb. 83a), die eine starke kovalente Bindung mit den beiden Au-NP eingehen und somit als molekulare Verbindung in einem Dimer dienen. Des Weiteren ermöglichen sie zum einen die Einstellung eines definierten Abstandes zwischen den beiden NP und zum anderen die Ankopplung funktioneller Gruppen. Bei Monomeren kommen statt Dithiolen Monothiole zur Anwendung, bei denen die zweite Thiol-Endgruppe durch eine Methyl-Gruppe ersetzt wurde (s. Abb. 83b). Damit ist eine kovalente Bindung an Au-NP nur auf der Seite mit der Thiol-Gruppe möglich. In beiden Dispersionen wird Aceton als Lösungsmittel benutzt.

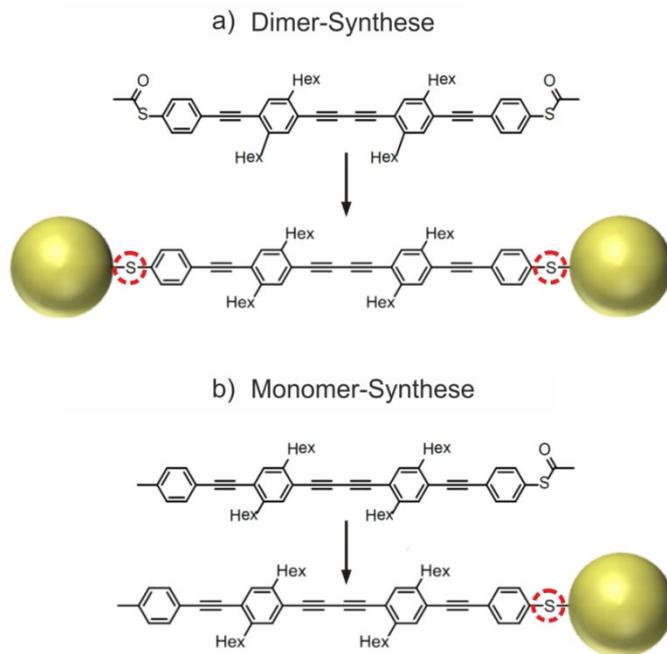


Abb. 83: Schematische Darstellung der Synthese von stäbchenförmigen Dithiolen und deren Anbindung an Au-NP. Mit der Herstellungsmethode nach Perrault lassen sich sowohl Dimere (a) als auch Monomere (b) präparieren. Die Dithiole haben 2 Thiol-Endgruppen (rote Kreise), die kovalente Bindung mit Au-NP eingehen. Bei Monothiolen wurde die zweite Thiol-Endgruppe durch eine Methyl-Gruppe ersetzt: Damit ist eine kovalente Bindung an Au-NP nur auf der Seite mit der Thiol-Gruppe möglich (adaptiert aus [296]).

Sowohl die NP als auch die Linker-Moleküle wurden von Ingo Heesemann in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Adelheid Godt hergestellt. Nähere Informationen über den Präparationsprozess können im Detail der Dissertation von Ingo Heesemann entnommen werden [296].

Des Weiteren lässt sich anhand der für die Probenpräparation verwendeten Edukte die durchschnittliche Beladungsdichte der Linker-Moleküle pro NP in einem Dimer berechnen. Unter Berücksichtigung der benutzten Menge an Ausgangsstoffen lässt sich die Anzahl von Au-NP in der Dimer-Dispersion zu ca. $5.7 \cdot 10^{12}$ abschätzen. Ausgehend von der molaren Masse eines Dithiol-Moleküls ($M = 887.34 \text{ g/mol}$) und der benutzten Dithiol-Masse von $m_{\text{Dithiol}} = 0.043 \text{ mg}$ beträgt die Stoffmenge $n = m_{\text{Dithiol}}/M = 4.8 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$. Die dazugehörige Molekülanzahl N errechnet sich dann zu $N = n \cdot N_A = 2.9 \cdot 10^{16}$. Daraus folgt, dass die durchschnittliche Bedeckungsdichte eines NP $B = 2.9 \cdot 10^{16} / 5.7 \cdot 10^{12} = 5088$ Linker-Moleküle pro nm^2 beträgt. Die Oberfläche eines 40 nm großen NP ist $A = 4 \cdot \pi \cdot r^2 = 5027 \text{ nm}^2$. Dies entspricht einer mittleren Beladungsdichte $B_{\text{Mittel}} = 1$ Dithiol-Molekül pro nm^2 . In der Literatur lassen sich vergleichbare Bedeckungsdichten finden: Die durchschnittliche Bedeckungsdichte von Thiophenolen in Form einer selbstaggregierenden Monolage (SAM) auf einem Gold-Substrat Au (111) beträgt zum Beispiel 4 Moleküle pro nm^2 . Die Diskrepanz in der Bedeckungsdichte der Dithiole und Thiophenole kann unterschiedliche Gründe haben. Im Vergleich zu einem dicht gepackten und hochgeordneten SAM besitzt ein Dithiol-Molekül Hexyl-Seitenketten, die für größere und zum Teil ungleichmäßige Abstände zwischen den an die NP-Oberfläche gebundenen Molekülen sorgen.

Probencharakterisierung

Vor und nach den durchgeführten Raman-Messungen wurden die zu analysierenden Monomer- und Dimer-Dispersionen in Bezug auf ihre Morphologie und chemische Stabilität in Aceton als Lösungsmittel charakterisiert. Dadurch konnten eventuelle Änderungen der Dispersionen durch die Laserbestrahlung oder Alterung der NP ausgeschlossen werden. Zur Messung wurden sowohl bildgebende (Transmissionselektronenmikroskopie) als auch spektroskopische (Absorptionsspektroskopie) Ansätze verfolgt, die im Folgenden vorgestellt werden.

a). Transmissionselektronenmikroskopie

Die hergestellten Au-NP-Monomere und Dimere können durch die Transmissionselektronenmikroskopie (engl. *Transmission Electron Microscopy, TEM*) hinsichtlich ihrer Form, Größe und Verteilung charakterisiert werden. Darüber hinaus kann der mittlere Partikelabstand in Dimeren anhand der TEM-Daten bestimmt werden. Dieser Parameter ist besonders kritisch für SERS-Messungen, da die maximale SERS-Verstärkung unter anderem von der Gap-Größe abhängt (vgl. Kap. 4.4.2). Die TEM-Aufnahmen können eine räumliche Auslösung von unter 1 nm erreichen, wodurch die Vermessung des Gaps möglich wird [299].

Die hier vorgestellten TEM-Daten wurden von Ingo Heesemann aufgenommen und ausgewertet und können seiner Dissertation entnommen werden [296].

Um die benötigten Präparationsparameter für eine möglichst hohe Ausbeute an Monomeren und Dimeren zu ermitteln, wurde für verschiedene Mono- und Dithiol-Konzentrationen aus TEM-Messungen die dazugehörige Ausbeute bestimmt. Dafür wurden 3 μl von der jeweiligen Dispersion entnommen und auf ein TEM-Netzchen aufgetragen. Um das Verklumpen einzelner Partikel infolge des Eintrocknens zu vermeiden, wurde das verwendete Lösungsmittel Aceton sofort mit einem Filterpapier abgezogen. Anschließend wurden Aufnahmen mit einem TEM (CM 100 ST, Philips) angefertigt. Eine exemplarische Aufnahme ist für eine Konzentration von $c_{\text{Monothiol}} = c_{\text{Dithiol}} = 0.1 \text{ g/l}$ in Abbildung 84 gezeigt.

Die Auswertung der TEM-Aufnahmen ergab, dass eine möglichst hohe Ausbeute an Monomeren im Fall der Monomer-Dispersion und an Dimeren im Fall der Dimer-Dispersion bei einer Konzentration von 0.1 g/l an Mono- bzw. Dithiol erreicht wird. Bei dieser Konzentration des Dithiols bilden sich vorwiegend Dimere und kleinere Aggregate (s. Abb. 84a). Größtenteils treten Monomere und Dimere und nur wenige Aggregate mit einer größeren Anzahl an Au-NP auf. Bei Unterschreitung der kritischen Dithiol-Konzentration von $c_{\text{Dithiol}} = 0.1 \text{ g/l}$ bilden sich in der Dimer-Dispersion vermehrt Monomere und größere Aggregate. Bei Überschreitung der kritischen Konzentration

können viele Dithiol-Moleküle an die bereits mit anderen Molekülen voll belegten NP nicht mehr binden und liegen als Niederschlag in der Dispersion vor.

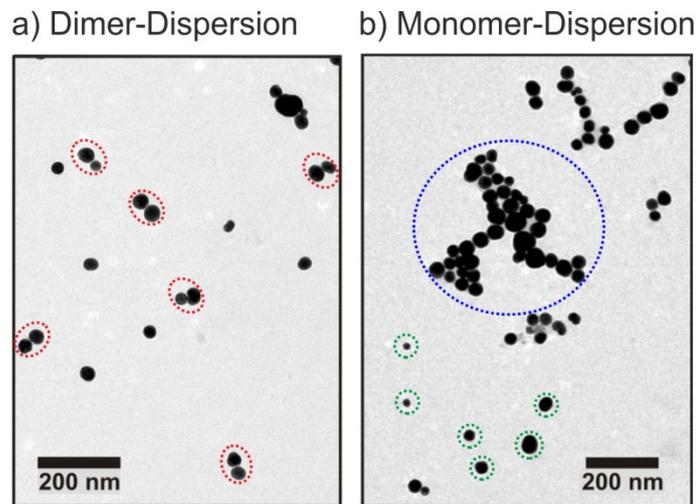


Abb. 84: Exemplarische TEM-Aufnahmen der Dimer-Dispersion (a) und der Monomer-Dispersion (b), wobei die Konzentration des Mono- und Dithiols jeweils $c_{\text{Monothiol}} = c_{\text{Dithiol}} = 0.1 \text{ g/l}$ beträgt. Die einzelnen Dithiol-verbrückten Dimere sind in a) rot gestrichelt umrandet. In b) liegen sowohl Monomere (grün gestrichelt) als auch Aggregate höherer Ordnung vor (blau gestrichelt) [296].

In der Monomer-Dispersion führt die oben genannte Konzentration primär zur Entstehung von sowohl Monomeren (s. Abb. 84b, grün gestrichelt) als auch von wesentlichen größeren Aggregaten (s. Abb. 84b, blau gestrichelt).

Anhand der TEM-Aufnahmen wurde die Verteilung einzelner NP-Aggregate durch Auszählen von 1700 Aggregaten in der Dimer-Dispersion (s. Abb. 85, rote Balken) und von 700 Aggregaten in der Monomer-Dispersion (s. Abb. 85, schraffierte Balken) bei einer Konzentration von $c_{\text{Monothiol}} = c_{\text{Dithiol}} = 0.1 \text{ g/l}$ bestimmt. Dabei erfolgte die Normierung der Häufigkeit eines NP-Aggregates auf die Gesamtzahl aller NP-Aggregate.

Aus der in Abbildung 85 angegebenen Verteilung ergibt sich eine durchschnittliche Ausbeute an Monomeren in der Monomer-Dispersion von 4.6% und an Dimeren in der Dimer-Dispersion von 13%. Neben den erwünschten Monomeren bzw. Dimeren liegen in beiden Proben auch weitere NP-Aggregate, wie Trimere, Tetramere und Aggregate höherer Ordnung, vor. In der Dimer-Dispersion bestehen größere Cluster im Durchschnitt aus 12 NP (s. Abb. 85, rote Balken, höhere Ordnung) und in der Monomer-Dispersion aus 40 NP (s. Abb. 85, schraffierte Balken, höhere Ordnung).

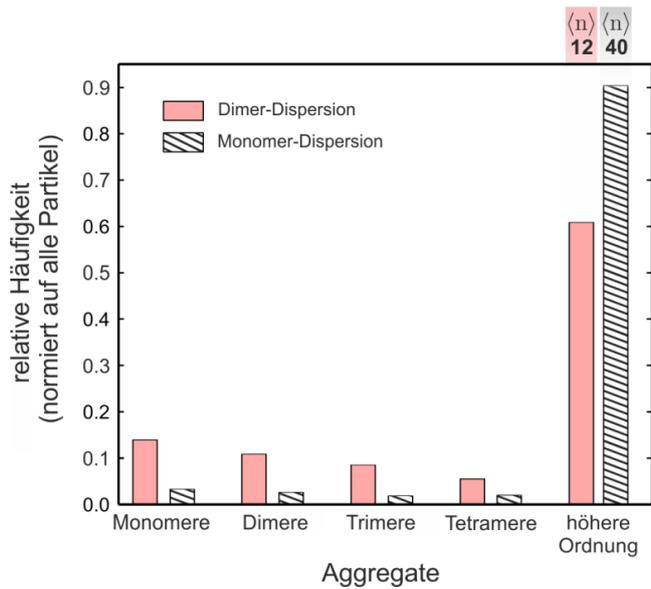


Abb. 85: Verteilung verschiedener Aggregate (Monomere, Dimere, Trimere, Tetramere und Aggregate höherer Ordnung) in den Monomer- (schraffierte Balken) und Dimer-Dispersionen (rote Balken). Die Häufigkeit eines NP-Aggregates ist auf die Gesamtzahl aller NP-Aggregate normiert. Die Anzahl der NP in größeren Clustern wird mit $\langle n \rangle$ gekennzeichnet (adaptiert aus [300]).

Daraufhin erfolgte die Bestimmung des mittleren Partikelabstands d_{Mittel} in einem Dimer. Dazu wurden in TEM-Messungen die Gap-Größen von insgesamt 60 Dimeren bestimmt. Eine exemplarische TEM-Aufnahme eines Dimers ist in Abbildung 86 gezeigt. Im Mittel ergibt sich der Abstand zweier NP zu $d_{mittel} = 1.64 \pm 0.35$ nm.

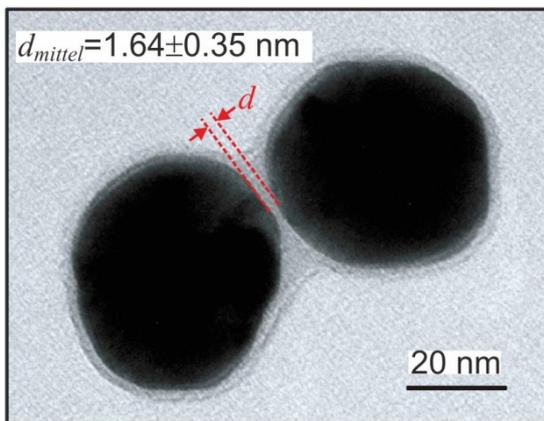


Abb. 86: Exemplarische TEM-Aufnahme eines Au-NP-Dimers mit dem in rot eingezeichneten Partikelabstand d . Anhand von 60 solchen Dimeren wurde der mittlere Abstand d_{mittel} zwischen zwei NP zu $d_{Mittel} = 1.64 \pm 0.35$ nm bestimmt (adaptiert aus [296]).

Es tritt eine Diskrepanz zwischen dem mittels TEM-Messungen bestimmten mittleren Partikelabstand $d_{mittel} = 1.64 \pm 0.35$ nm und der theoretisch bestimmten Länge des Linker-Moleküls $l_{Molekül} = 3.1$ nm auf (vgl. Kap. 4.4.2). Der Unterschied lässt sich anhand des Verhaltens von Dithiolen erklären, die auf einer Gold-Oberfläche dicht gepackte selbstaggregierende Monolagen bilden. Bereits 1995 haben J. M. Tour et. al anhand von Dithiol-SAMs gezeigt, dass die Moleküle nicht senkrecht zur Normalen der Gold-Oberfläche stehen, sondern sich unter einem Neigungswinkel anordnen, der maximal 20° beträgt [301]. Extrapoliert man dieses Verhalten auf die Moleküle zwischen den Au-NP in Dimeren, so ergibt sich das in Abbildung 87 gezeigte Bild. Das beobachtete Verhalten der Dithiole legt die Vermutung nahe, dass die einzelnen Linker-Moleküle im Gap keine hochgeordnete und dicht gepackte Schicht bilden, wie SAMs. Das lässt sich dadurch

erklären, dass die Dithiole ihrer polaren Umgebung ausweichen, indem sie untereinander hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Daraus ergeben sich unterschiedliche Neigungswinkel.

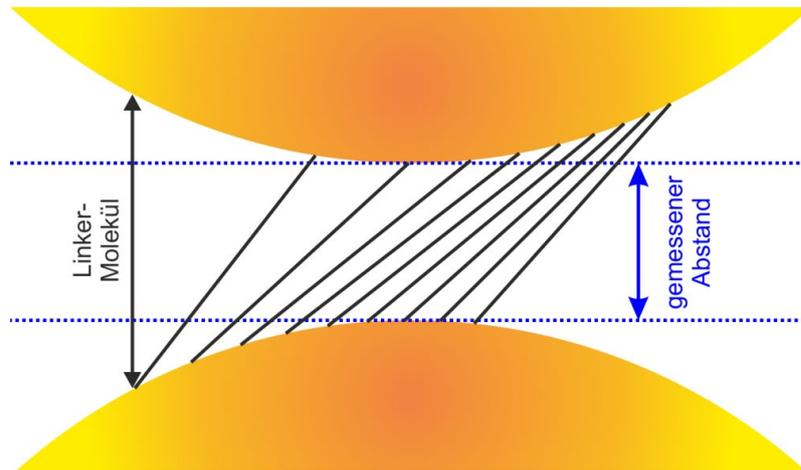


Abb. 87: Schematische Darstellung eines Dithiol-verbrückten Dimers. Die Linker-Moleküle zwischen den beiden NP sind um einen gewissen Winkel gegen die Oberflächennormale geneigt. Diese Neigungswinkel variieren leicht zwischen den Molekülen im Gap. Aus dem Neigungswinkel resultiert die Diskrepanz zwischen $l_{\text{Molekül}}$ und d_{mittel} .

Um die Reproduzierbarkeit der SERS-Daten zu verifizieren, wurden die Monomer- und Dimer-Dispersionen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vermessen. An beiden Tagen erfolgte die Probencharakterisierung mit dem TEM. Basierend auf den TEM-Aufnahmen konnten die durchschnittliche NP-Größe und der durchschnittliche Abstand zwischen zwei Au-NP in einem Dimer bestimmt werden. Für die untersuchten Monomer- und Dimer-Dispersionen konnte im Zeitraum von 2 Tagen keine signifikanten Änderungen in ihrer Form, Größe und Verteilung festgestellt werden.

b) Absorptionsspektroskopie (UV-Vis-Spektroskopie)

Die maximale lokale Überhöhung des elektromagnetischen Feldes und damit die maximale SERS-Verstärkung treten auf, wenn die optische Anregung nahe der Plasmonenresonanzfrequenz stattfindet (vgl. Kap. 4.4.2). Aufgrund dessen muss vor allem sichergestellt werden, dass die verbrückend wirkenden Dithiol-Moleküle zwischen den beiden Au-NP keinen merklichen Einfluss auf die Absorption der Dimer-Dispersion haben. Die Absorptionmessungen wurden mit einem UV-Vis-Spektrometer Lambda 25 von Perkin Elmer durchgeführt. Beim verwendeten Gerät handelt es sich um ein Zweistrahlenspektrometer, d. h. es bestand die Möglichkeit, sowohl die Dispersion (Probe) als auch das Lösungsmittel (Referenz) gleichzeitig zu messen. Dies ist insbesondere

wichtig, um eventuelle Lösungsmittelleffekte, wie beispielsweise Eigenabsorption, zu eliminieren.

Es wurden UV-Vis-Spektren von der Dimer-Dispersion und der reinen Dithiol-Lösung ohne Au-NP aufgenommen (s. Abb. 88).

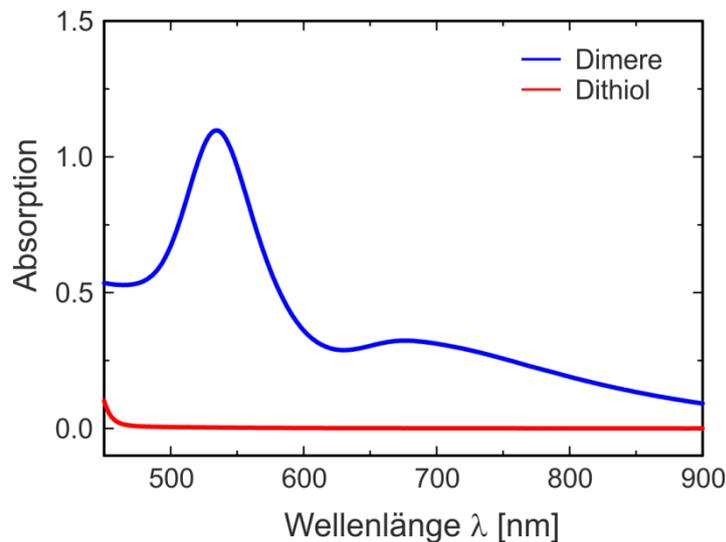


Abb. 88: Exemplarische Absorptionsspektren der Dithiol-verbrückten Dimere (blau) und der reinen Dithiolen (rot) in Aceton als Lösungsmittel, aufgenommen mit einem UV-Vis-Spektrometer. Im Spektralbereich zwischen 450 nm und 900 nm weist die Absorption der Dimer-Lösung zwei Maxima um 530 nm und 650 nm auf, die auf Plasmonenresonanzen der Au-NP zurückzuführen sind. Die Absorption der Dithiolen hingegen ist annähernd konstant und vernachlässigbar gering. Somit ist der Einfluss der verbrückend wirkenden Dithiolen im Zwischenraum zweier NP vernachlässigbar.

Anhand der in Abbildung 88 vorgestellten UV-Vis-Daten wird ersichtlich, dass die Absorption der reinen Dithiolen im Spektralbereich zwischen 450 nm und 900 nm vernachlässigbar gering ist. Somit kann der Einfluss der Linker-Moleküle auf die resultierenden Plasmonenresonanzen der Dimere ausgeschlossen werden.

Die Alterung einer kolloidalen Lösung, bedingt unter anderem durch Temperatur und die Eigenschaften des Dispergiermediums, geht mit Änderungen ihrer Zusammensetzung einher. Um die chemische Langzeitstabilität der zu untersuchenden Suspension nachzuweisen, wurden UV-Vis-Messungen vorgenommen. Dazu wurde die Dimer-Dispersion vor und nach den Raman-Messungen untersucht. Mögliche Variationen in der Komposition der Dispersion würden zu Änderungen der Lichtabsorption in der zu analysierenden Probe führen. In Abbildung 89 sind exemplarische UV-Vis-Spektren der Dithiol-verbrückten Dimere vor und nach den Raman-Messungen gezeigt.

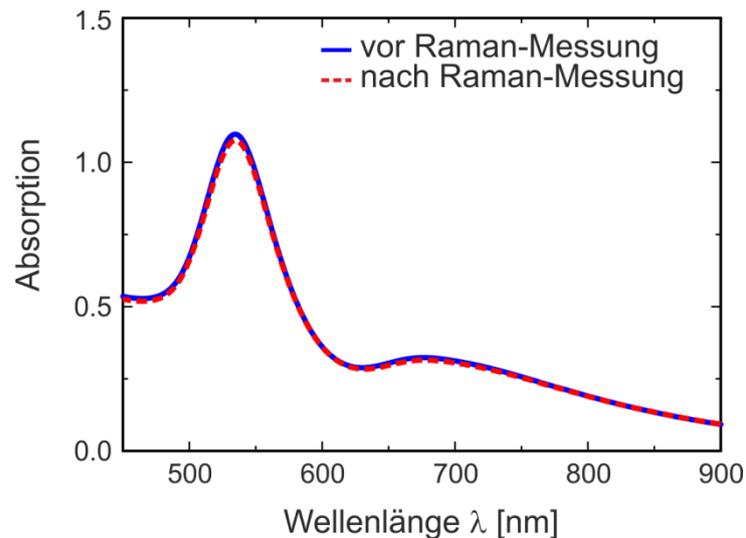


Abb. 89: Absorption der Dimer-Dispersion in Aceton in einer Quarz-Küvette im Spektralbereich zwischen 450 nm und 900 nm. Die UV-Vis-Spektren wurden vor (blau) und nach den Raman-Messungen (rot gestrichelt) aufgenommen. Beide Spektren sind bis auf minimale Unterschiede gleich und weisen zwei Peaks bei 530 nm und 670 nm auf.

Die Peaks bei 530 nm und ca. 670 nm in den UV-Vis-Spektren rühren von Plasmonenresonanzen her und hängen dementsprechend stark von der Größe, Form, Material und Umgebung der NP ab (vgl. Kap. 4.4.2). Der Peak bei 530 nm kann einer reinen Monomer-Resonanz isolierter sphärischer Au-NP zugeordnet werden. Bei der gleichen Wellenlänge erwartet man auch eine Dimer-Plasmonenresonanz. Bei dieser Resonanz ist das Dimer so orientiert, dass die Polarisation des einfallenden Lichts senkrecht auf der Dimer-Achse steht. In diesem Fall ist die Kopplung zweier NP vernachlässigbar [302].

Die hybridisierte Dimer-Resonanz erscheint rotverschoben bei ca. 670 nm. Dabei ist die Polarisation der einfallenden elektromagnetischen Strahlung parallel zur Dimer-Achse ausgerichtet [302]. Der Peak bei ca. 670 nm ist in Abbildung 89 nicht stark ausgeprägt und spektral verbreitert. Deswegen lässt sich seine genaue spektrale Position nicht exakt bestimmen. Zum einen ist dies auf eine vergleichsweise geringe Ausbeute an Dimeren von ca. 13% zurückzuführen (vgl. Kap. 4.4.3). Zum anderen tragen neben Dimeren auch andere Aggregate zur Gesamtresonanz bei. Zum Beispiel kommt es zur Hybridisierung der Plasmonenresonanzen auch bei Trimeren. Prinzipiell lässt sich ein Trimer in Dimere zerlegen und bei der gezeigten Beleuchtungsgeometrie wird hauptsächlich die dimerartige Mode des vertikal orientierten Dimers angeregt (s. Abb. 90). Im Endeffekt führt der Trimer-Beitrag zu einer Rotverschiebung und Verbreiterung der spektralen Resonanz. Eine näherungsweise Zerlegung in Dimere kann auch für Aggregate höherer Ordnung vorgenommen werden. Auch diese führen dann zu einer weiteren Verbreiterung der reinen Dimer-Resonanz.

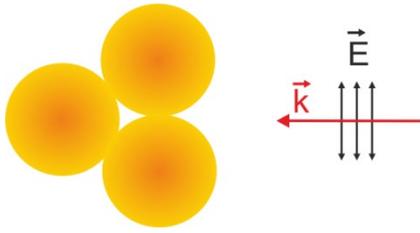


Abb. 90: Schematische Darstellung eines Au-NP-Trimers bestrahlt mit einer einfallenden ebenen Welle. In Abhängigkeit von der Orientierung des Aggregats kann ein Trimer auch eine einem Dimer vergleichbare Plasmonenresonanz aufweisen und somit zum Absorptionspeak der Dimere bzw. dessen Verbreiterung beitragen.

Darüber hinaus sind die in Abbildung 89 gezeigten Absorptionsspektren annähernd identisch. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die optische und damit auch chemische Stabilität der Dimer-Dispersion über die Dauer einer Raman-Messung gegeben ist.

4.4.4 Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie

Der Schwerpunkt dieses Projekts liegt auf der Untersuchung des SERS-Effekts im Gap zweier Au-NP. Aus diesem Grund müssen die verbrückend wirkenden Moleküle in einem Dimer mindestens eine chemische Gruppe aufweisen, deren Schwingung zu einem definierten Raman-Peak führt. Dieser sollte möglichst nicht mit anderen Raman-Resonanzen korrelieren. Diese Gruppe dient also als interner Marker für die Signalverstärkung. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Linker-Moleküle verfügen neben den beiden funktionellen Thiol-Gruppen über vier Alkin-Bindungen (vgl. Abb. 83). Diese Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindungen erfüllen zweierlei Zwecke: Zum einen tragen sie durch ihre Starrheit zu einem definierten Abstand zwischen den beiden NP in einem Dimer bei, zum anderen agieren sie als „Raman-Marker“. Die $C\equiv C$ -Streckschwingung der Alkin-Gruppe resultiert in einem Peak im Bereich um 2250 cm^{-1} , welcher im stillen Bereich zwischen 1800 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} liegt und somit keine Korrelation mit anderen Schwingungen aufweist (vgl. Kap. 2.4) [303]. Die genaue Peakposition kann im Bereich zwischen 2100 cm^{-1} und 2270 cm^{-1} variieren und ist abhängig davon, welche weiteren Nebengruppen an die oben genannten Alkin-Gruppen gebunden sind (vgl. Gl. 2.7) [10].

Das in Kapitel 3 vorgestellte Raman-Spektrometer ermöglicht die Anregung im Vis- und NIR-Spektralbereich mit 488 nm, 514 nm, 568 nm, 633 nm, 647 nm und 785 nm. Die beiden Monomer- und Dimer-Dispersionen wurden einzeln mit diesen Anregungswellenlängen untersucht. Ein nennenswerter SERS-Effekt wird zwar nur bei Dimeren erwartet, als Referenz wurde jedoch auch die Monomer-Dispersion analysiert. Die Abbildung 91 zeigt exemplarische Spektren, die von der Dimer-Dispersion aufgenommen wurden. Aus Übersichtsgründen wurden hier nur 3 von den gesamten 6 Anregungswellenlängen dargestellt.

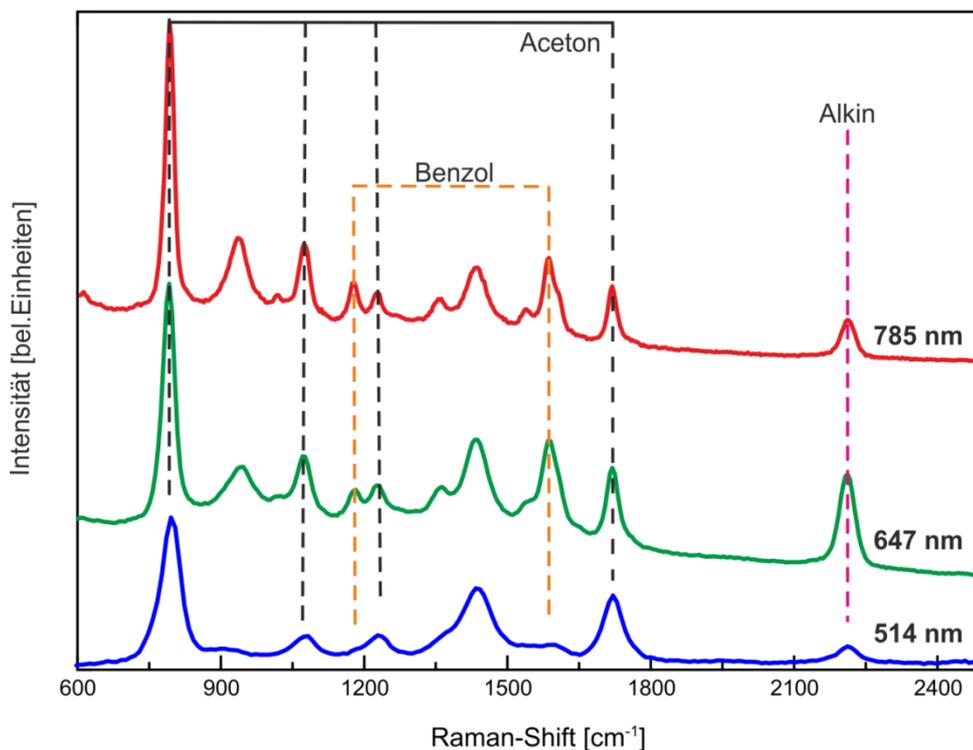


Abb. 91: Exemplarische Raman-Spektren der Dimer-Dispersion in Aceton in einer Quarz-Küvette. Aus Übersichtsgründen sind hier die exemplarischen Spektren mit drei Anregungswellenlängen (514 nm (blau), 647 nm (grün) und 785 nm (rot)) gezeigt. Die Daten wurden mit einem 20x Trockenobjektiv (NA 0.4), einer fokalen Leistung von 10 mW und einer Integrationszeit von 1 s aufgenommen. Die einzelnen Peaks wurden Aceton (schwarz), Benzol (orange) und Alkin (magenta) zugeordnet. Die Spektren wurden jeweils auf die Peakfläche der symmetrischen C-C-Streckschwingung von Aceton bei 790 cm^{-1} normiert (adaptiert aus [300]).

Die Peaks mit den höchsten Amplituden stammen überwiegend vom verwendeten Lösungsmittel Aceton $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (s. Abb. 91, schwarz): symmetrische C-C-Streckschwingung bei 790 cm^{-1} , CH_3 -Mode bei 1091 cm^{-1} , asymmetrische C-C-Streckschwingung bei 1221 cm^{-1} und C=O-Streckschwingung bei 1710 cm^{-1} [304].

Den größten Signalbeitrag liefert der Aceton-Peak der symmetrischen C-C-Streckschwingung bei 790 cm^{-1} . Das Raman-Signal von Aceton erfährt keine nahfeldinduzierten Verstärkungseffekte und wird demzufolge von seiner Umgebung nicht beeinflusst [305]. Die Streckschwingung bei 790 cm^{-1} eignet sich somit besonders gut für die Normierung eines im Nahfeld verstärkten Raman-Peaks des Linker-Moleküls bei Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen. Anzumerken ist, dass die Normierung nicht auf die Spitzenintensität eines Peaks, sondern auf die darunterliegende Fläche erfolgt.

Neben den bereits genannten Raman-Peaks des Lösungsmittels und der Streckschwingung der Alkin-Gruppe bei 2250 cm^{-1} (s. Abb. 91, magenta) sind zwei weitere Raman-Peaks bei 1179 cm^{-1} und 1596 cm^{-1} sichtbar (s. Abb. 91, orange). Diese

lassen sich den sogenannten „Benzolfingern“ des Linker-Moleküls (vgl. Abb. 83) zuordnen: Der C-H-Biegeschwingung bei 1179 cm^{-1} und der Streckschwingung des Benzol-Ringes bei 1596 cm^{-1} . Da die beiden Benzol-Peaks und der Alkin-Peak vom verwendeten Linker-Molekül herrühren, kommen sie alle als potentielle „Raman-Marker“ in Frage. Aufgrund ihrer Lage im stillen Bereich wurde für die Auswertung jedoch die Alkin-Resonanz gewählt.

Zur Untersuchung der Wellenlängenabhängigkeit des SERS-Signals der Dimere wurde der Alkin-Peak in Relation zum Aceton-Peak bei 790 cm^{-1} gesetzt (s. Abb. 92, rot). Der Vergleich zwischen dem Aceton-Peak, der nicht im Nahfeld verstärkt wird, und dem im Nahfeld verstärkten Alkin-Peak liefert die SERS-Verstärkung. Um den Verstärkungseffekt eindeutig auf die Anwesenheit der Dimere zurückzuführen, wurde als Referenz auch die wellenlängenabhängige Analyse der Monomer-Dispersion durchgeführt (s. Abb. 92, blau).

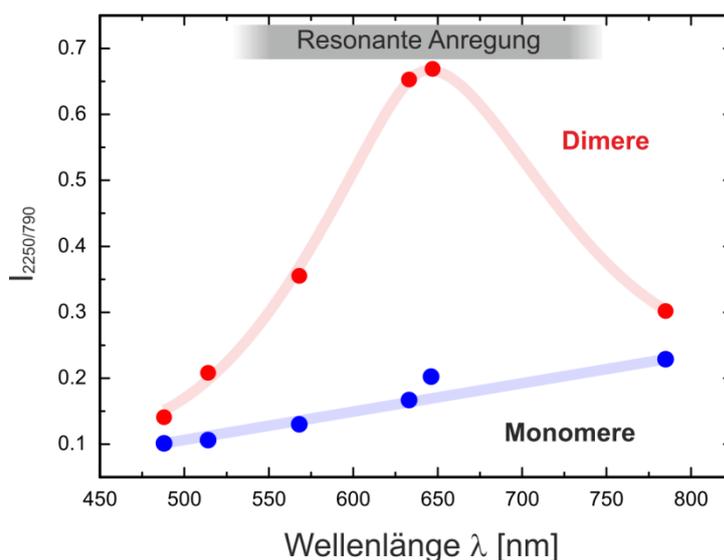


Abb. 92: Abhängigkeit des normierten Alkin-Signals bei 2250 cm^{-1} (normiert auf die Fläche des Aceton-Peaks bei 790 cm^{-1}) von der Anregungswellenlänge (488 nm, 514 nm, 568 nm, 633 nm, 647 nm und 785 nm). Für die Dimer-Dispersion (rote Kreise) ergibt sich ein Maximum bei ca. 650 nm. Für die Monomer-Dispersion (blaue Kreise) wird ein mit der Wellenlänge monoton steigender Verlauf beobachtet. Die Messpunkte einer Dispersion wurden mit Linien miteinander verbunden, die aber keinem theoretischen Fitmodell entsprechen und nur den wahrscheinlichsten Kurvenverlauf darstellen sollen (adaptiert aus [300]).

Der Monomer-Graph (s. Abb. 92, blaue Kurve) zeigt eine monoton anwachsende Tendenz mit der steigenden Wellenlänge ohne Extremwerte, während sich bei den Dimeren (s. Abb. 92, rote Kurve) ein deutlich ausgeprägtes Maximum bei ca. 650 nm beobachten lässt. Dessen Position lässt sich aufgrund des flachen Anstieges zwischen 633 nm und 647 nm abschätzen. An den Wellenlängenstützpunkten 488 nm, 514 nm und bei 785 nm liegen die Messpunkte für Monomere und Dimere nahe beieinander. Dies

spricht für eine vergleichbare SERS-Verstärkung der beiden Dispersionen in diesem Spektralbereich. Das für die Dimere beobachtete deutliche Maximum bei ca. 650 nm impliziert ein (nahezu) resonantes Verhalten, d. h. die longitudinale Welle des SP und die transversale Welle des einfallenden Lichts einer bestimmten Frequenz stimmen in ihrer Energie und ihrem Impuls (nahezu) überein. Die genaue Position des Maximums der Dimer-Kurve in Abbildung 92 lässt sich allerdings aufgrund einer fehlenden Anregungswellenlänge im Bereich zwischen 647 nm und 785 nm nicht bestimmen. Die Absorptionsspektren der Dimer-Dispersion in Abbildung 89 zeigen ebenfalls eine Plasmonenresonanz bei ca. 670 nm, obwohl ihre exakte spektrale Lage wegen der Verbreiterung nicht eindeutig bestimmbar ist. Unter Berücksichtigung dessen kann man behaupten, dass die Gegenüberstellung der beiden durch SERS und die Absorptionsspektroskopie erhaltenen Plasmonenresonanzen eine gute Überstimmung zeigt und die gekoppelte Plasmonenresonanz eines Dimers zwischen 650 nm und 670 nm liegt.

Im Fall der Monomer-Dispersion, die als Referenz benutzt wurde, erwartet man keine nennenswerte Änderung bei Anregung mit verschiedenen Wellenlängen [306]. Stattdessen lässt sich eine leicht zunehmende Tendenz beobachten (s. Abb. 92, blaue Kurve). Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass in dieser Dispersion neben Monomeren und kleineren Clustern auch größere NP-Cluster vorkommen, die im Durchschnitt aus 40 NP bestehen (vgl. Abb. 84b und 85). Auch bei größeren NP-Clustern treten Hybridisierungen der Plasmonenresonanzen auf und damit auch rotverschobene Resonanzbeiträge im Spektrum [307]. Dies würde den leichten Anstieg der Monomer-Kurve im NIR-Bereich erklären (vgl. Kap. 4.4.2).

Der Vergleich der gemessenen Monomer- und Dimer-Verstärkungskurve (s. Abb. 92) zeigte, dass die anhand des normierten Alkin-Peaks bestimmte Signalverstärkung in beiden Dispersionen bei nicht-resonanter Anregung ähnlich ist. Im resonanten Fall hingegen (bei ca. 650 nm) ist die Verstärkungskurve der Dimer-Lösung um einen Faktor 5-6 höher als die der Monomer-Lösung. Die aufgenommenen UV-Vis-Spektren der Dimer-Dispersion (s. Abb. 89) zeigen ebenfalls ein Maximum in diesem Wellenlängenbereich. Das dort beobachtete Maximum bei ca. 670 nm lässt sich der hybridisierten Plasmonenresonanz zuordnen. Es wird daraus geschlussfolgert, dass die detektierte Signalverstärkung um einen Faktor 5-6 primär von der Überhöhung des lokalen elektromagnetischen Feldes im Gap eines NP-Dimers herrührt. Trotz der vergleichsweise geringen Ausbeute an Dimeren von ca. 13% in einer nicht-fraktionierten Dispersion (vgl. Kap. 4.4.3) lässt sich eine deutliche Signalerhöhung im Vergleich zur ebenfalls nicht-fraktionierten Monomer-Dispersion beobachten. Dabei ist zu beachten, dass die Signalverstärkung bei der Dimer-Lösung nicht durch NP-Agglomerate höherer Ordnung zu erklären ist. Deren relative Häufigkeit ist sogar in der Dimer-Lösung geringer als in der Monomer-Lösung. Zur weiteren Untersuchung des Verstärkungsprozesses werden im nachfolgenden Kapitel 4.4.5 die experimentell gewonnenen Daten mit Simulationen verglichen.

4.4.5 Simulation der Absorptionsspektren und Nahfeldverteilungen im resonanten und nicht-resonanten Fall

Durch Simulationen kann der SERS-Effekt an den Au-NP-Dimeren weiter untersucht werden. Zum einen können die Absorptionsspektren in erster Linie für Dimere, aber auch für Monomere und kleinere Aggregate, wie Trimere und Tetramere, simuliert werden, um deren Einfluss auf die Plasmonenresonanz der Dimere zu bestimmen. Diese ist ausschlaggebend für die resultierende SERS-Verstärkung: Je weiter die Anregungsfrequenz von der Plasmonenresonanzfrequenz entfernt ist, desto schwächer ist der SERS-Verstärkungseffekt. Zum anderen kann auch die räumliche Verteilung des elektromagnetischen Feldes um ein NP-Dimer simuliert werden, die später zur Berechnung des SERS-Verstärkungsfaktors berücksichtigt werden muss. Dieser Verstärkungsfaktor hängt unter anderem von der Anzahl der partizipierenden Moleküle ab, wobei sie in Abhängigkeit von ihrer Position bezüglich der Au-NP in unterschiedlichem Maße zur Verstärkung beitragen (vgl. Kap. 4.4.2).

Bereits 1908 erfolgte die theoretische Beschreibung der Plasmonenanregung isolierter kugelförmiger Au-NP durch Gustav Mie [308]. In seiner Arbeit hat er die exakte analytische Lösung der Maxwell-Gleichungen für das Absorptions- und Streuverhalten idealisierter Au-NP bestimmt. Dabei wurden sowohl die Eigenschaften einzelner NP durch ihre Größe und dielektrische Funktion als auch der Einfluss des umgebenden Mediums durch seine dielektrische Funktion berücksichtigt.

Die Feldverteilungen werden nicht nur um Monomere, sondern auch Dimere und höhere Agglomerate berechnet. Die Mie-Theorie ist jedoch auf die Anregung eines einzelnen sphärischen NP beschränkt, weshalb numerische Methoden verwendet werden, um die Lichtpropagation in komplexeren NP-Systemen zu modellieren. Die hier gezeigten Simulationen wurden durch die Methode der finiten Differenzen im Zeitbereich (engl. *Finite-Difference Time-Domain*, *FDTD*) mit einer kommerziell erhältlichen Software durchgeführt (FDTD Solutions, Lumerical Solutions).

Die Funktionsweise von FDTD beruht auf der Unterteilung des Raums in Elementarquader, sogenannte Yee-Zellen, wobei deren Abmessungen die Genauigkeit des Verfahrens und somit die Simulationsdauer bestimmen. An jedem Gitterpunkt des diskretisierten Raums wird die Intensität des elektromagnetischen Feldes durch Lösen der Maxwell-Gleichungen in Abhängigkeit von der Anregungsfrequenz berechnet. Nach den Simulationen wird das zeitliche Verhalten in den Frequenzraum mittels der Fourier-Transformation überführt [309].

In den hier durchgeführten Simulationen wurden ein Durchmesser eines Au-NP von 40 nm, Aceton als Umgebungsmedium und die Größe einer Yee-Zelle von 0.5 nm in jeder Richtung gewählt. Im Rahmen dieses Kooperationsprojekts wurden die FDTD-

Simulationen von Matthias Hensen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Pfeiffer ausgeführt und sind detailliert in seiner Dissertation dargestellt [310].

a) Simulation der Absorptionsspektren

In den nachfolgenden FDTD-Simulationen können die Linker-Moleküle, Dithiole, nicht berücksichtigt werden. Für die dort berechnete Nahfeldverteilung wird davon ausgegangen, dass nur die Au-NP und deren geometrische Anordnung einen signifikanten Beitrag liefern. Diese Annahme ist nur gerechtfertigt, wenn die Dithiole keine nennenswerte Absorption im Resonanzbereich der Au-NP-Dimere aufweisen. In der Abbildung 88 ist zu erkennen, dass die Absorption der reinen Dithiole im Spektralbereich zwischen 450 nm und 900 nm unbedeutend gering ist. Somit können die FDTD-Simulationen zur Bestimmung der Nahfeldverteilung unter Vernachlässigung der Linker-Moleküle durchgeführt werden.

Die Berechnung der Absorptionsspektren der Dimere erfolgte für verschiedene Gap-Größen d zwischen den beiden Au-NP: $d = 0.7$ nm, $d = 1.0$ nm und $d = 1.3$ nm (s. Abb. 93a, farbige Kurven). Der Absorptionsquerschnitt der Monomere wurde ebenfalls berechnet (s. Abb. 93a, schwarze Kurve). Während für die Monomere nur eine einzelne Resonanz bei 530 nm auftritt, erscheint bei den Dimeren (s. Abb. 93a, farbige Kurven) eine zusätzliche rotverschobene Resonanz bei höheren Wellenlängen. Die spektrale Position dieser Resonanz verschiebt sich dabei mit der Gap-Größe d : Bei Vergrößerung von d sinkt die Kopplungsstärke zwischen den beiden Au-NP.

In Abbildung 93b sind zum Vergleich die experimentellen Absorptionsspektren der Monomer- und der Dimer-Dispersion gezeigt. Obwohl die Gegenüberstellung der simulierten und gemessenen Daten eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment zeigt, gibt es jedoch auch Unterschiede. Die experimentell gemessene Absorption der Monomer-Dispersion (s. Abb. 93b, schwarze Kurve) weist zusätzlich eine leicht ansteigende Absorption im NIR-Spektralbereich auf, die in den simulierten Spektren nicht vorhanden ist (s. Abb. 93a, schwarze Kurve). Dies lässt sich durch die Anwesenheit von größeren NP-Clustern in der Monomer-Dispersion begründen [311], wobei die einzelnen Cluster durchschnittlich aus 40 NP bestehen (vgl. Kap. 4.4.3).

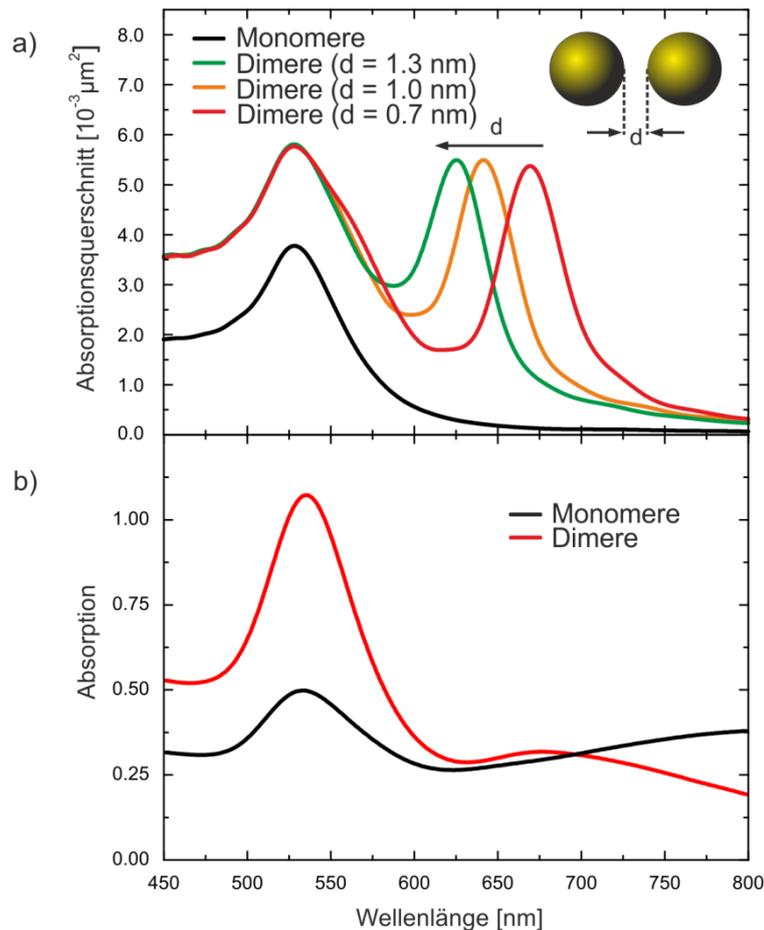


Abb. 93: FDTD-Simulationen zur Bestimmung des Absorptionsquerschnittes für ein Monomer-Partikel (schwarze Kurve) und Dimer-Partikel mit verschiedenen Gap-Größen d (farbige Kurven): $d = 1.3 \text{ nm}$ (grün), $d = 1.0 \text{ nm}$ (orange), $d = 0.7 \text{ nm}$ (rot). b) Mittels der Absorptionsspektroskopie gemessene Spektren von einer Monomer-Lösung (schwarze Kurve) und einer Dimer-Lösung (rote Kurve). Die Zusammensetzung der Monomer- und Dimer-Dispersionen wurde in Kapitel 4.4.3 beschrieben (adaptiert aus [300]).

Sowohl die simulierten als auch die experimentellen Dimer-Absorptionsspektren weisen zwei Resonanzen auf (s. Abb. 93a, farbige Kurven und 93b, rote Kurve). Die Resonanz bei 530 nm stammt von den isolierten Au-NP in der Lösung (vgl. die Monomer-Kurve) oder von den Dimeren her, deren Achse senkrecht zur Polarisation des einfallenden Lichts ist [306]. Die berechneten Spektren der Dimere zeigen ein weiteres Maximum zwischen 620 nm und 680 nm in Abhängigkeit vom Abstand zweier NP (von $d = 0.7 \text{ nm}$ bis $d = 1.3 \text{ nm}$) auf. Dieses lässt sich auf die Dimere zurückführen, deren Achse parallel zur Polarisation einfallender Strahlung ausgerichtet ist [306]. Die mittels der Absorptionsspektroskopie gemessene Dimer-Kurve weist ebenfalls einen Peak bei ca. 670 nm auf, der allerdings durch die Anwesenheit anderer kleinerer Aggregate in der Dispersion verbreitert wurde (s. Abb. 93b, rote Kurve). Des Weiteren ist seine Intensität deutlich geringer im Vergleich zur simulierten Dimer-Kurve (s. Abb. 93a, farbige Kurven). Die entstandene Diskrepanz kann unter Berücksichtigung der

Zusammensetzung der Dimer-Dispersion erklärt werden: In den FDTD-Simulationen wurde von einer Dimer-Lösung ausgegangen, in der nur Dimere vorliegen. Die Messungen erfolgten aber an nicht-fractionierten und nicht-aufgereinigten Dispersionen, in denen die Dimer-Ausbeute lediglich ca. 13% in Bezug auf alle vorhandenen Aggregate betrug (vgl. Kap. 4.4.3).

Da die Plasmonenresonanzen kleinerer Aggregate eine spektrale Ähnlichkeit zu den Plasmonenresonanzen der Dimere aufweisen [262], wurden FDTD-Simulationen verschiedener NP-Konstellationen durchgeführt, um die spektrale Lage der Plasmonenresonanzen von Trimeren und Tetrameren zu bestimmen. Die berechneten Absorptionsquerschnitte sind in Abbildung 94 gezeigt.

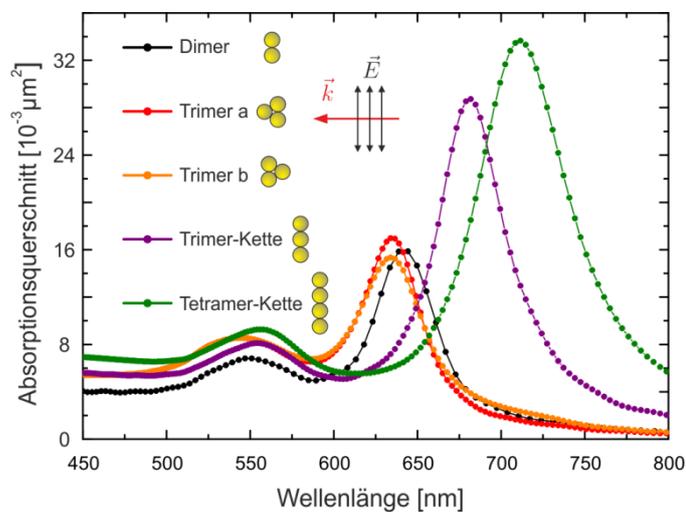


Abb. 94: FDTD-Simulationen der Absorptionsspektren von Dimeren, Trimeren und Tetrameren in Abhängigkeit von deren Orientierung zur Einfallsebene des Lichtes, wobei der interpartikuläre Abstand hier 1 nm beträgt (adaptiert aus [300]).

Alle in Abbildung 94 gezeigten simulierten Absorptionsspektren besitzen ein Maximum im Spektralbereich zwischen 530 nm und 560 nm, das sich der Plasmonenresonanz isolierter Au-NP zuordnen lässt [306]. Die berechnete Dimer-Resonanz für die parallele Ausrichtung der Dimer-Achse hinsichtlich des einfallenden Lichtes liegt bei ca. 645 nm, während sich die Trimer-Resonanz für eine Tripod-Orientierung bei ca. 630 nm und für eine kettenähnliche Ausrichtung ca. 685 nm befindet. Für die Tetramere in Form einer Kette erwartet man ein zweites Maximum bei ca. 720 nm. Somit zeigen die FDTD-Daten, dass die gekoppelten Resonanzen, vor allem in den Dimeren und Trimeren, spektral sehr nahe beieinander liegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass kleine NP-Aggregate die Verbreiterung der Dimer-Resonanz im NIR-Bereich in den experimentellen Absorptionsspektren hervorrufen (vgl. Abb. 93b, rote Kurve).

Sowohl in den experimentellen als auch in den simulierten Absorptionsspektren befindet sich das Maximum der hybridisierten Dimer-Plasmonenresonanz im Wellenlängenbereich

zwischen 620 nm und ca. 680 nm (vgl. Abb. 93). Anhand der Raman-Daten lässt sich die maximale SERS-Verstärkung in einer Dimer-Dispersion ebenfalls in diesem Bereich (bei ca. 650 nm) detektieren (vgl. Abb. 92). Allerdings liefern die experimentellen Daten eine spektral verbreitete Dimer-Plasmonenresonanz. Dies erschwert die Bestimmung deren genauen Spektrallage. Insgesamt lässt sich aber sagen, dass eine gute Überstimmung zwischen gemessenen Absorptionsspektren, simulierten Absorptionsspektren und SERS-Spektren besteht.

b) Simulation der Feldverstärkung um die Nanopartikel

Aus der experimentell bestimmten wellenlängenabhängigen Dimer-Verstärkungskurve (vgl. Abb. 92) und aus den beobachteten Resonanzen in den Absorptionsspektren (vgl. Abb. 93b) lässt sich folgern, dass Dimere sowohl resonant als auch nicht resonant angeregt werden können. In beiden Fällen kommt es zu Nahfeldüberhöhungen um die NP, wobei diese Überhöhung für eine resonante Anregung deutlich höher ausfällt. Dieses Verhalten wird im Folgenden durch FDTD-Simulationen untersucht.

Im Rahmen der FDTD-Simulationen wurde die ortsaufgelöste Feldverstärkung bei nicht-resonanter (473 nm) und resonanter (633 nm) Anregung in einem Dimer simuliert (s. Abb. 95). Diese Wellenlängen wurden analog zu den Wellenlängen gewählt, die bei Raman-Messungen zur Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors durchgeführt wurden (s. Kap. 4.4.6).

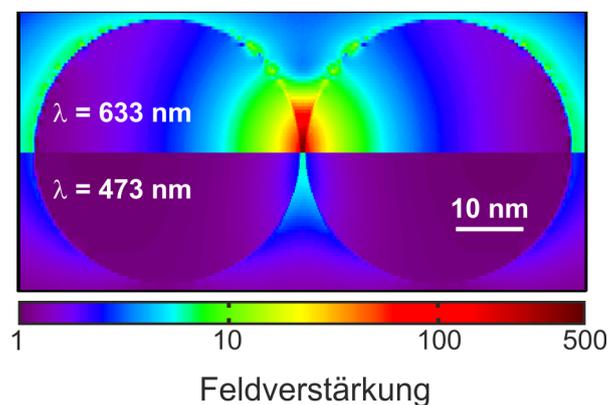


Abb. 95: FDTD-Simulation der räumlichen Verteilung der elektromagnetischen Feldverstärkung für ein Dimer im Fall einer nicht-resonanten (473 nm, untere Hälfte) und einer resonanten (633 nm, obere Hälfte) Anregung. Die Feldverstärkung ist auf die Feldamplitude der einfallenden ebenen Welle normiert. Der Abstand der beiden Au-NP beträgt hier 1 nm und die einfallende Welle ist entlang der Dimer-Achse polarisiert (adaptiert aus [300]).

Bei nicht-resonanter Anregung mit 473 nm ist eine nahezu homogene geringfügige Feldverstärkung um die NP zu beobachten, wobei sie einen Faktor von ca. 7 entlang der

Dimer-Achse beträgt (s. Abb. 95, untere Hälfte). Bei resonanter Anregung mit 633 nm tritt eine deutliche Feldverstärkung auf: Im Gap zweier NP ist sie am stärksten und beträgt ca. 300 (s. Abb. 95, obere Hälfte), nach außen hin nimmt die Feldverstärkung graduell ab. Auf der NP-Oberfläche außerhalb vom Gap werden Feldverstärkungen von etwa 10 erreicht.

Das simulierte Verstärkungsverhalten in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge stimmt somit mit den experimentellen gemessenen Verstärkungen überein: Basierend auf der Auswertung der Raman-Spektren erfährt die C≡C-Streckschwingung der Alkine in einem Dimer bei resonanter Anregung mit 647 nm die größte Signalerhöhung. Bei nicht-resonanter Anregung mit 488 nm lässt sich keine signifikante Verstärkung beobachten und die Werte sind für die Monomer- und Dimer-Kurven vergleichbar (vgl. Abb. 92).

Diese Feldverteilung muss bei der Berechnung des SERS-Verstärkungsfaktors in Betracht gezogen (vgl. Kap. 4.4.2). Bei resonanter Anregung ist die lokale Feldüberhöhung in einem Dimer überwiegend auf die Linker-Moleküle zwischen den beiden Au-NP zurückzuführen und der Beitrag der ungebundenen Dithiole in der Dimer-Dispersion kann demzufolge vernachlässigt werden (s. Abb. 96). Bei nicht-resonanter Anregung ist dies nicht mehr der Fall. Hier müssen auch ungebundene Dithiole berücksichtigt werden, weil sowohl ungebundene als auch gebundene Linker-Moleküle nahezu gleichermaßen zum gesamten SERS-Signal beitragen. Daher muss der Anteil ungebundener Linker-Moleküle in der zu untersuchenden Dispersion vom Gesamtsignal subtrahiert werden.

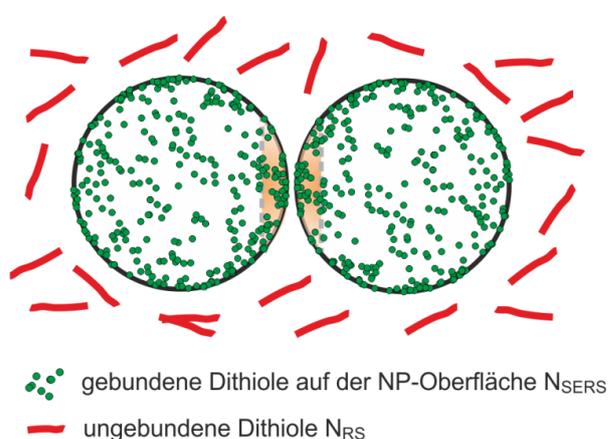


Abb. 96: Schematische Darstellung der Linker-Molekül-Verteilung in der Dimer-Dispersion, in der die Dithiole sowohl ungebunden (rot) als auch kovalent gebunden (grün) vorliegen. In orange wird der Ort der maximalen lokalen Feldüberhöhung markiert. Bei resonanter Anregung kann der Beitrag ungebundener Dithiole zum Verstärkungsfaktors EF vernachlässigt werden. Bei nicht-resonanter Anregung ist dies nicht mehr der Fall: Sowohl ungebundene als auch gebundene Dithiole müssen berücksichtigt werden (adaptiert aus [300]).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführten FDTD-Simulationen die Details der gemessenen Absorptionsspektren gut reproduzieren konnten. Die in Kapitel 4.4.3 aufgestellte Vermutung, dass die spektrale Verbreiterung der rotverschobenen Dimer-Plasmonenresonanz durch die Anwesenheit von Trimer- und Tetramer-Aggregaten hervorgerufen wird, konnte hier bestätigt werden. Des Weiteren wurde auch die deutliche Wellenlängenabhängigkeit der SERS-Verstärkung reproduziert.

4.4.6 Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors für Dimere

Zur Quantifizierung der in Kapitel 4.4.4 gemessenen SERS-Signalverstärkung und zur Herstellung der Vergleichbarkeit zu den SERS-Daten in der Fachliteratur muss der Verstärkungsfaktor EF berechnet werden (vgl. Kap. 4.4.2). Im Folgenden wird er für die im Experiment durchgeführten SERS-Messungen und für die in Kapitel 4.4.5 vorgestellten FDTD-Simulationen bestimmt.

- a) Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors anhand der experimentellen SERS-Daten

Der EF wird mittels Gl. 4.5 aus den gemessenen Daten errechnet:

$$EF = \frac{I_{SERS}/N_{SERS}}{I_{RS}/N_{RS}} \quad (4.5)$$

wobei I_{SERS} die Intensität des oberflächenverstärkten Signals und I_{RS} die Intensität des nicht-oberflächenverstärkten Signals sind. N_{SERS} gibt die Anzahl der adsorbierten Moleküle auf dem SERS-Substrat (z. B. NP) an, während N_{RS} die Anzahl der Raman-aktiven Moleküle im Streuvolumen ist.

Bei der Bestimmung des EF ist zu beachten, dass bei Raman-Messungen von reinem Dithiol (ohne Au-NP) und von den Dithiol-verbrückten Dimeren die Konzentration der Dithiol-Moleküle in den beiden Lösungen identisch gewählt werden muss.

Im Spektrometer des aufgebauten Raman-Systems sind insgesamt drei Gitter eingebaut, wobei sich nur eins davon für die Anregung mit 488 nm eignet (vgl. Abb. 25). Allerdings hat es nur 300 Striche pro mm und somit eine vergleichsweise geringe Auflösung, denn diese ist proportional zur Anzahl der Rillen des Gitters. Infolgedessen kann der Alkin-Peak bei 2250 cm^{-1} in reinem Dithiol mit diesem Reflexionsgitter im zur Auswertung benötigten Maße nicht aufgelöst werden. Aus diesem Grund wurden folgende Messungen an einem kommerziellen konfokalen Raman-Spektrometer (LabRAM, ARAMIS, Horiba) mit einem Gitter mit 1800 Strichen pro mm in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Pfeiffer von Matthias Hensen durchgeführt.

Die Raman-Spektren der Dithiole ohne NP und der Dimer-Dispersion wurden für den nicht-resonanten (473 nm) und den resonanten Fall (633 nm) aufgenommen (s. Abb. 97).

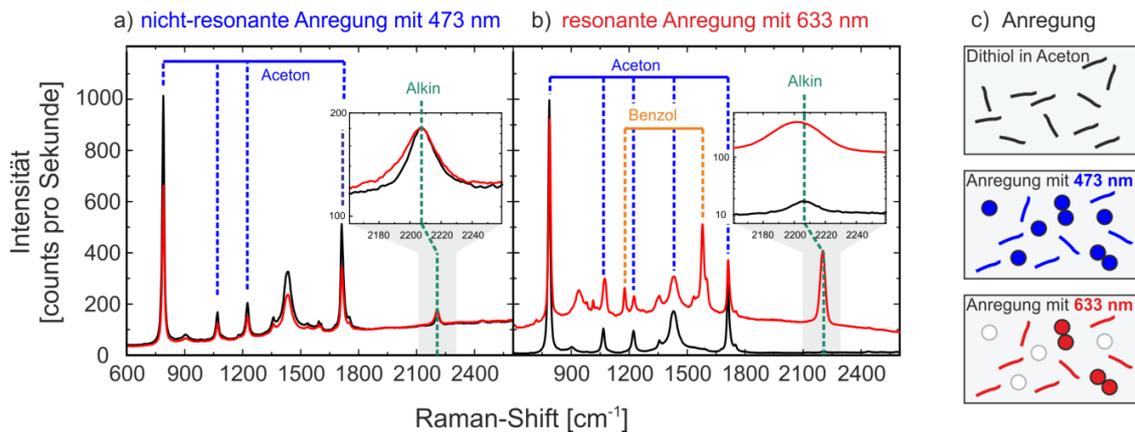


Abb. 97: Raman-Spektren der Dimer-Dispersion (rote Kurve) und der reinen Dithiol-Lösung (schwarze Kurve) für den nicht-resonanten (a) und resonanten (b) Fall. In c) wird das zugehörige Verstärkungsverhalten für Dithiol und Dimere in Aceton gezeigt. Die Spektren wurden mit einer fokalen Leistung von 1.7 mW (473 nm) und 2.5 mW (633 nm), einem 10x Trockenobjektiv (NA 0.25) und einer Belichtungszeit von 30 s aufgenommen (adaptiert aus [300]).

Im nicht-resonanten Fall (s. Abb. 97a) lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen reinen Dithiolen und der Dimer-Dispersion in Bezug auf den Alkin-Peak bei 2250 cm^{-1} feststellen. Dahingegen kommt es bei resonanter Anregung (s. Abb. 97b) der Dimer-Dispersion zu einer deutlichen Signalverstärkung im Vergleich zu einer reinen Dithiol-Lösung.

Die Bestimmung des Verstärkungsfaktors erfolgte über die Intensität der $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung der Alkine. Im nicht-resonanten Fall ist die Intensität des Alkin-Peaks I_{SERS} in der Dimer-Dispersion nach der Normierung auf den Aceton-Peak bei 790 cm^{-1} 1.8 mal höher als die Intensität des Alkin-Peaks I_{RS} in der reinen Dithiol-Lösung ohne Au-NP. Bei resonanter Anregung beträgt dieses Verhältnis I_{SERS}/I_{RS} schon 73.

Bei diesen Werten wurden allerdings ungebundene Dithiole, die ebenfalls einen Beitrag zur Gesamtverstärkung leisten, noch nicht berücksichtigt (vgl. Kap. 4.4.5). Nach der Aufnahme der Raman- und Absorptionsspektren wurden auch Absorptionmessungen am Überstand der Dimer-Dispersion vorgenommen. Darunter versteht man die Dimer-Dispersion, bei der die Dimere mit den daran gebundenen Dithiolen durch Zentrifugation zum Absinken auf den Boden der verwendeten Quarz-Küvette gebracht wurden. Oberhalb dieses Niederschlages befinden sich ungebundene Dithiole, an denen die Absorptionmessungen erfolgten. Unter Berücksichtigung des Beer-Lambert-Gesetzes lässt sich über die Konzentration die Masse ungebundener Dithiol-Moleküle zu $m_{ungebunden} = 0.062\text{ mg}$ bestimmen. Für die Herstellung wurde eine $m_{Dithiol} = 0.105\text{ mg}$ benutzt [296]. Daraus folgt, dass 59% der gesamten Dithiole ungebunden sind.

Infolgedessen muss der Beitrag der ungebundenen Moleküle ($0.59 \cdot I_{RS}$) am Raman-Spektrum der Dimer-Lösung berücksichtigt werden. Dazu wird deren Anteil vom gesamten Raman-Signal subtrahiert. Für das Verhältnis I_{SERS}/I_{RS} ergibt sich dann:

$$\frac{I_{SERS}}{I_{RS}}(473 \text{ nm}) = \frac{I_{Gesamt} - 0.59 \cdot I_{RS}}{I_{RS}} = 1.8 - 0.59 = 1.21$$

$$\frac{I_{SERS}}{I_{RS}}(633 \text{ nm}) = \frac{I_{Gesamt} - 0.59 \cdot I_{RS}}{I_{RS}} = 73 - 0.59 = 72$$

Die um den Einfluss der ungebundenen Moleküle korrigierten Verstärkungsfaktoren sind nur geringfügig kleiner: Bei nicht-resonanter Anregung tragen sie zu 33% dazu bei und bei resonanter Anregung zu 0.8%. Dies stimmt auch mit der mittels FDTD simulierten räumlichen Feldverteilung in einem Dimer (vgl. Abb. 95) überein: Im resonanten Fall rührt die Gesamtverstärkung vor allem von den Molekülen im Gap her und ungebundene Dithiole tragen zwar auch, aber im vernachlässigbaren Maße dazu bei. Im nicht-resonanten Fall ist die räumliche Feldverteilung um das Dimer nahezu homogen, deshalb ist auch der Beitrag der ungebundenen Dithiole zur Gesamtverstärkung deutlich größer und nicht mehr vernachlässigbar.

Da die Dimer-Dispersion nicht fraktioniert und nicht aufgereinigt wurde, lassen sich die Konzentrationen der Dithiole anhand der verwendeten Menge an Edukten zu $c_{SERS} = 2 \cdot 10^{16} \text{ ml}^{-1}$ (für die Dimer-Dispersion) und $c_{RS} = 5 \cdot 10^{16} \text{ ml}^{-1}$ (für die Dithiol-Lösung) abschätzen. Diese Werte sind aufgrund der Beziehung $N = c \cdot V$ proportional zu N_{SERS} bzw. N_{RS} . Das Volumen der verwendeten Küvette beträgt 1.4 ml.

Damit ergibt sich unter Verwendung der Gleichung 4.5 für den nicht-resonanten Fall der Verstärkungsfaktor $EF(473 \text{ nm}) = 3$ und für den resonanten Fall $EF(633 \text{ nm}) = 180$.

b) Bestimmung des Verstärkungsfaktors anhand der simulierten Feldverteilungen

Analog zur Rechnung in [23] wurde der durchschnittliche Verstärkungsfaktor $\langle EF \rangle$ für eine homogene Beladungsdichte von 1 nm^{-2} (vgl. Kap. 4.4.3) basierend auf der mittels FDTD berechneten Feldverstärkung bestimmt. Für eine resonante Anregung mit 633 nm und bei der Orientierung der Polarisation des einfallenden Lichts entlang der Dimer-Achse beträgt er $\langle EF \rangle = 6 \cdot 10^7$ und ist damit in guter Übereinstimmung mit in der Fachliteratur zu findenden Werten [254], [312]. Ausgehend von einer homogenen Verteilung der Analytmoleküle auf der metallischen Oberfläche haben Etchegoin et al. den durchschnittlichen Verstärkungsfaktor $\langle EF \rangle$ für Dimere mit unterschiedlichen Eigenschaften berechnet [312]. Dabei variierten sie die Größe der einzelnen NP (zwischen 25 nm und 50 nm), den Partikelabstand (zwischen 1 nm und 3 nm) und das Material (Gold und Silber). Die theoretischen Rechnungen ergaben, dass 0.3% bis 1.1% der an den NP adsorbierten Analytmoleküle für ca. 80% der gesamten SERS-Signalverstärkung verantwortlich sind.

Wird die gleiche Rechnung für zufällig orientierte Dimere bei ebenfalls resonanter Anregung durchgeführt, so resultiert dies in einem um eine Größenordnung geringeren

Verstärkungsfaktor $\langle EF \rangle = 4 \cdot 10^6$. Ein vergleichbarer Wert für Dimere wurde auch von Kleinman et al. angegeben [313].

Der anhand der experimentellen Daten bestimmte SERS-Verstärkungsfaktor von $EF(633 \text{ nm}) = 180$ ist dagegen ca. 4 Größenordnungen kleiner als der theoretisch berechnete Wert von $4 \cdot 10^6$. Dies deutet darauf hin, dass auch die Feldverstärkung aufgrund der $I_{SERS} \propto |E|^4$ -Abhängigkeit ebenfalls mindestens 16 Größenordnungen geringer sein muss. Zum einen kann diese Diskrepanz daher rühren, dass die untersuchte Dimer-Dispersion neben anderen NP-Aggregaten nur ca. 13% Dimere enthält. Bei der theoretischen Rechnung hingegen wird von einer reinen Dimer-Dispersion mit einer hohen Ausbeute an diesen NP-Strukturen ausgegangen.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass die verwendeten Linker-Moleküle als elektronischer Kontakt zwischen den NP in einem Dimer fungieren, wie es bei der Einzelmolekülkontaktierung der Fall ist: Ein an zwei Metall-Elektroden kovalent bindendes Molekül mit konjugierten Gruppen stellt eine Brücke für die Elektronen der elektrischen Kontakte dar. Die Elektronen können beispielsweise über die molekulare Brücke von einer Elektrode zur anderen tunneln. Dies führt zu einem Ladungstransport zwischen den Elektroden, der als Stromfluss nachgewiesen werden kann [314]. Die elektronische Kopplungsstärke eines Einzelmolekülkontakts hängt dabei in erster Linie vom verwendeten Molekül und vom Elektrodenabstand ab. Als Elektroden können mechanisch kontrollierte Bruchkontakte oder die Abtastspitze eines Rastertunnelmikroskops dienen [315].

Übertragen auf das betrachtete Dimer-System bedeutet dies: Infolge der elektronischen Ankopplung der beiden NP durch ein Linker-Molekül könnte es zum lichtinduzierten quantenmechanischen Tunneln der Elektronen zwischen den Nanopartikeln eines Dimers kommen (vgl. Kap. 4.4.2). Dieser Effekt führt zur Verringerung des resultierenden SERS-Signals: Durch Abfließen der Ladungen wird die Oberflächenladungsdichte auf den gegenüberliegenden Seiten der molekularen Brücke reduziert. Dies geschieht bereits bei einer Leistungsdichte von 10^9 W/cm^2 und einem Gap von 1 nm [289]. Enthält das verbrückend wirkende Molekül konjugierte Bindungen, wie es im Fall von Dithiol ist, so kann der Tunnelprozess bereits bei niedrigeren Leistungsdichten einsetzen. Da am Ort der maximalen Feldverstärkung zwischen den beiden Au-NP sich nicht nur ein Dithiol-Molekül befindet, sondern mehrere, wird der Gesamtverstärkungsfaktor noch weiter herabgesetzt [285].

4.4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Projektes wurde das wellenlängenabhängige Verstärkungsverhalten SERS-aktiver Nanopartikel-Dimere untersucht. Diese bestehen aus zwei Au-NP, die mit einem organischen Linker-Molekül verbunden sind, das aufgrund der vorhandenen Alkin-Gruppen gleichzeitig als interner Raman-Marker fungiert. Die Raman-Messungen erfolgten an nicht-fraktionierten Dispersionen, in denen sowohl kovalent an die NP gebundene als auch ungebundene Analytmoleküle zur Gesamtverstärkung beitragen. Der jeweilige Anteil hängt dabei davon ab, ob resonant oder nicht-resonant angeregt wird. Anhand der SERS-Spektren konnten die spektralen Bereiche resonanter und nicht-resonanter Anregung identifiziert werden. Die stärkste resonante Anregung wurde für den Spektralbereich von 600 nm bis 700 nm beobachtet. Ergänzend wurden FDTD-Simulationen und Absorptionsmessungen durchgeführt, welche die gemessenen Raman-Daten bestätigen.

Bisher wurden vergleichbare Messungen an fraktionierten und aufgereinigten Dimeren durchgeführt. Die der Analyse vorausgehenden Trennungsprozesse sind jedoch mit einem Austausch des Lösungsmittels und mit der Entfernung ungebundener Analytmoleküle verbunden. Des Weiteren kann auch die unerwünschte Desorption bereits gebundener Linker-Moleküle infolge der Fraktionierung und Aufreinigung der Dimer-Dispersion stattfinden. Dies macht eine realistische Abschätzung des Bedeckungsgrades der Nanopartikel in einem Dimer und damit eine zuverlässige Bestimmung des SERS-Verstärkungsfaktors unmöglich.

Der SERS-Verstärkungsfaktor wurde basierend auf simulierten und gemessenen Daten bestimmt und unter Berücksichtigung der aktuellen einschlägigen Literatur diskutiert. Aus den SERS-Spektren konnte ein Verstärkungsfaktor für die Dimer-Dispersion zu 180 bei resonanter Anregung und zu 3 bei nicht-resonanter Anregung bestimmt werden. Bei der Berechnung wurde auch die Menge an ungebundenen Molekülen berücksichtigt. FDTD-Simulationen ergaben hingegen einen Verstärkungsfaktor von $4 \cdot 10^6$. Als Erklärung für die Diskrepanz zwischen den gemessenen und simulierten Verstärkungsfaktoren wurden eine geringe Ausbeute an Dimeren in der untersuchten Dispersion und der bisher nicht berücksichtigte Tunneltransport zwischen den Nanopartikeln eines Dimers angeführt.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Aspekte sind die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Dimer-Strukturen ein vielversprechendes und robustes Testmodell zur Klärung weiterer offener Fragen. Ein verringerter Verstärkungsfaktor ließe sich auf elektronische Tunnelprozesse zurückzuführen, die über die verwendeten Linker-Moleküle beeinflusst werden könnten. Eine Variation der Linker-Moleküle würde eine weitere Untersuchung dieses Einflusses ermöglichen. Dabei könnte auch der Einfluss einer eventuellen chemischen Signalverstärkung überprüft werden. Würden beispielsweise zusätzliche Seitenketten, die ebenfalls Raman-aktive Gruppen (z. B. Nitril-Gruppen)

enthalten, an das Rückgrat des Linker-Moleküls angekoppelt und in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge untersucht werden, so könnte man daraus Rückschlüsse auf den Anteil der eventuell vorhandenen chemischen Verstärkung schließen. Die Seitenketten sollten in einem Fall vom Rückgrat des Dithiol-Moleküls elektronisch entkoppelt und im zweiten Fall sowohl an das Rückgrat elektronisch gebunden als auch davon entkoppelt vorliegen. Anschließend würde man SERS-Messungen an beiden Proben durchführen. Aus dem Vergleich der erzielten Verstärkung könnte man auf beteiligte Mechanismen schließen: Bei einer elektronisch entkoppelten Gruppe wäre die Verstärkung alleine auf die elektromagnetische Feldverstärkung zurückzuführen, während im anderen Fall die Signalerhöhung aufgrund beider Verstärkungsmechanismen erfolgen würde. Ein besseres Verständnis des SERS-Mechanismus würde eine wichtige Rolle bei der Optimierung der Anwendung der Dimere als pH-Sensoren, Sensoren für niedrig konzentrierte Biomoleküle, wie z. B. Glucose, oder Marker für die *in vivo* Detektion von Tumoren spielen [259].

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konfokales Raman-Spektrometer mit Raster-Scanfunktion aufgebaut (s. Kap. 3.1), mit dem sowohl Fluoreszenz- als auch Raman-Messungen mit unterschiedlichen Wellenlängen im sichtbaren und nahen Infrarotbereich durchgeführt werden können. Durch die Flexibilität des aufgebauten Raman-Spektrometers konnten komplexe biologische Systeme (s. Kap. 4.1 und 4.2) charakterisiert und Raman-Messungen an nanoskopischen Proben mit nur noch wenigen Molekülen durchgeführt werden (s. Kap. 4.3 und 4.4).

Die Atherosklerose ist eine der häufigsten Todesursachen für den Menschen [14]. Für die patientenbezogene Therapie ist es von großer Wichtigkeit, den Fortschritt der Krankheit zu bestimmen. Dafür müssen die in den Arterien angelagerten Plaques genau charakterisiert werden. Die bereits im klinischen Bereich eingesetzten Untersuchungsmethoden, wie histologische Färbung oder intrakoronare Ultraschalluntersuchung, dienen weniger der Strukturanalyse, sondern viel mehr der Lokalisierung und der Stadieneinteilung der vorhandenen Läsionen [17], [126]. Demzufolge lassen sich keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Vulnerabilität der vorhandenen Plaques und damit auch des damit verbundenen Gesundheitsrisikos treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Aorta-Gewebeschnitte mit atherosklerotischen Bereichen untersucht (s. Kap. 4.1). Die aufgenommenen Raman-Spektren ermöglichten eine eindeutige Identifizierung und Unterscheidung verschiedener Formen von Plaques (weich, fibrotisch, kalzifiziert). Es konnten sowohl Kalzium- und Protein-spezifische Raman-Banden als auch Carotinoide identifiziert werden. Auch eine Differenzierung zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in den Plaques war möglich. Darüber hinaus wurde die chemische Zusammensetzung der drei Arterien-schichten bestimmt, die Rückschlüsse auf die Ausbreitung der Atherosklerose in der zu untersuchenden Probe zuließ: Die krankhaften Gefäßwandveränderungen breiten sich von der *Intima* zur *Adventitia* aus. Es kamen ebenfalls die bildgebenden Methoden CARS und SHG zur Anwendung, um das beobachtete Verhalten zu bestätigen. Dafür wurden in den Raman-Spektren einzelne Resonanzen ausgewählt, die dann durch die CARS-Messungen orts aufgelöst abgebildet werden konnten.

Daraufhin wurden die gewonnenen Kenntnisse mit einem histologischen Befund verglichen. Die Gegenüberstellung ergab, dass die Raman-Spektroskopie zusätzliche Informationen über die Zusammensetzung der zu untersuchenden Probe lieferte. Beispielsweise ließ sich anhand der histologischen H&E-Färbung im Unterschied zur spontanen Raman-Spektroskopie keine Plaques unterhalb einer Kalzifizierung erkennen.

In Zukunft wäre es somit denkbar, die spontane Raman-Spektroskopie in Kombination mit einer nachgeschalteten Auswertung durch multivariate statistische Verfahren zur

direkten Analyse der Gewebestruktur während einer Operation einzusetzen. Dazu müsste die Anregung und Detektion des Raman-Signals durch ein Endoskop erfolgen.

Anschließend wurde die noch wenig erforschte ölreiche Mikroalgenart *Monoraphidium neglectum* untersucht (s. Kap. 4.2). Unter Einwirkung von wachstumsfördernden Faktoren, wie Lichtstrahlung und Stickstofflimitierung, bildet diese Algenart Lipid-Tröpfchen, die später in Biokraftstoff umgewandelt werden könnten. Es wurde die Effizienz der Lipidanreicherung in Abhängigkeit von diesen Faktoren analysiert. Dabei musste in der Messung der Sättigungsgrad der vorliegenden Fettsäuren bestimmt werden, denn nur gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren kommen für eine Ölsynthese in Frage. Zudem galt es ebenfalls zu bestimmen, ob vom durchschnittlichen Lipidakkumulationsverhalten in einer Algenpopulation auf das in einzelnen Algen geschlossen werden kann. Die detektierten spektralen Anteile stammten primär von Lipiden und Pigmenten, den Carotinoiden. Der starke Lipid-Anteil spricht für eine hohe Lipid-Produktivität von *Monoraphidium neglectum*. Indem Raman-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Einwirkdauer der Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden, konnte auch eine tendenzielle Zunahme an gesättigten Fettsäuren gezeigt werden. Der Messfehler war dabei jedoch so groß, dass nur ein Trend der Lipidanreicherung gesehen werden konnte. Dieses Verhalten konnte auch durch die chromatographischen Daten bestätigt werden.

Durch eine Hauptkomponentenanalyse der gemessenen Raman-Spektren konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Algen gleiche Raman-Signaturen aufweisen. Bezüglich des Sättigungsgrades der Fettsäuren kann somit von einigen wenigen Algen auf die gesamte Algenpopulation geschlossen werden.

Raman-Messungen an Nanometer dünnen Schichten sind herausfordernd, da deren schwaches Raman-Signal in der Regel vom Hintergrundsignal des Substrates überlagert wird. Es wurde daher ein Fabry-Perót-ähnlicher Nanoresonator aufgebaut, der durch eine Kombination aus einem planaren und einem konvexen Spiegel eine feldverstärkende Kavität bildet (s. Kap. 4.3). Indem die Oberflächen mit einer Silberschicht bedampft wurden, konnte eine Güte von $Q = 31$ erreicht werden. Dementsprechend erhöht sich auch die Feldstärke des Anregungslichtes innerhalb der Kavität. Als Referenz wurde eine Kavität ohne Silberbeschichtung verwendet, die eine Güte von lediglich $Q = 0.17$ aufwies. Als „Proof-of-Principle“ diente eine fluoreszierende Probe. Innerhalb des ersten Beugungsmaximums konnte ein Verstärkungsfaktor von 16 ± 0.17 beobachtet werden. Daraufhin wurde die Nanokavität dazu benutzt, unterschiedliche organische Dünnschicht-Systeme zu analysieren. Während Lipid-Multilagen ein zu schwaches Raman-Signal lieferten, konnte für eine PMMA-Schicht ein Verstärkungsfaktor von 1.75 ± 0.03 bestimmt werden. AFM-Messungen zeigten, dass die Schicht jedoch sehr inhomogen war, was den geringen Verstärkungsfaktor eventuell erklären könnte. Dahingegen wurde für eine Graphen-Monolage mit einer Schichtdicke von unter 1 nm ein Verstärkungsfaktor von 11 ± 0.27 gemessen.

Eine weitere Signalverstärkung könnte erreicht werden, indem durch eine transparente Abstandsschicht (z. B. 40-60 nm Quarz) die zu untersuchende Probe genau in der Mitte des Resonators positioniert wird. Dort herrscht die größte Feldüberhöhung und es könnte somit eine größere Verstärkung erreicht werden. Gleichzeitig würde der sogenannte Spacer die dünne Silberschicht vor Oxidation und anderen externen Einflüssen schützen. Des Weiteren könnte man das Borosilikat-Substrat durch ein MgF_2 -Substrat ersetzen, das sich durch ein geringeres Hintergrundsignal auszeichnet (vgl. Kap. 3.3).

Eine weitere Möglichkeit, die Empfindlichkeit der spontanen Raman-Spektroskopie zu erhöhen, basiert auf dem Einsatz von Edelmetall-Nanopartikeln in direkter Umgebung der zu untersuchenden Substanz. Eine optische Anregung von Oberflächenplasmonen an der Luft-Metall-Grenzfläche führt zur Überhöhung des lokalen elektromagnetischen Feldes um die Nanopartikel. Innerhalb des starken Nahfeldes kommt es zu einer Verstärkung des Raman-Signals (vgl. Kap. 2.2.3). Diese Methode wird als oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) bezeichnet. Ein besonders starkes Nahfeld wird vor allem zwischen zwei Nanopartikeln erzielt, weshalb diese für Untersuchungen hier verwendet wurden. In dieser Arbeit wurden Raman-aktive organische Kohlenstoff-Dreifachbindungen enthaltende Moleküle zwischen zwei Gold-Nanopartikeln in Aceton als Lösungsmittel untersucht (s. Kap. 4.4). entscheidende Unterschied zu bereits publizierten Ergebnissen bestand darin, dass die analysierte Lösung nicht aufgereinigt und nicht fraktioniert wurde, d. h. in der Probe befanden sich neben Dimeren auch Monomere, Trimere, Tetramere und Aggregate höherer Ordnung, die ebenfalls zum gesamten Raman-Signal beitragen. Mit Hilfe von sechs verschiedenen Anregungswellenlängen wurde das resonante und nicht-resonante Verhalten der Dimere systematisch untersucht. Dazu wurde das Verhältnis zwischen den Peakflächen von der stärksten Aceton- und der Alkin-Resonanz $I_{2250/790}$ gebildet. Für die verwendeten Dimere konnte ein Maximum dieses Verhältnisses bei ca. 650 nm beobachtet werden. Demzufolge wurde eine resonante Anregung für den Spektralbereich von 600 nm bis 700 nm nachgewiesen.

Zusätzlich wurde die elektromagnetische Feldverteilung um das Dimer im Rahmen von FDTD-Simulationen für resonante und nicht-resonante Anregung bestimmt. Die experimentell gewonnenen Raman-Daten wurden mit Simulationen verglichen und es konnte eine gute Übereinstimmung beobachtet werden. Des Weiteren wurden die Verstärkungsfaktoren für den nicht-resonanten Fall zu 3 und für den resonanten Fall zu 180 bestimmt. Im Unterschied zu bereits veröffentlichten Publikationen wurden bei den Simulationen auch die adsorbierten Moleküle auf der gesamten Nanopartikel-Oberfläche und ungebundene Moleküle in der Lösung berücksichtigt, die auch zur Gesamtverstärkung des Raman-Signals beitragen. Darüber hinaus wurde der Verstärkungsfaktor für die resonante Anregung anhand der FDTD-Simulationen zu $4 \cdot 10^6$ berechnet. Die Diskrepanz zu dem experimentell bestimmten Wert könnte auf ein quantenmechanisches Tunneln zwischen den Nanopartikeln zurückgeführt werden, das

seinerseits das Abfließen der Ladungen und somit die Verringerung des SERS-Effekts zur Folge hätte.

Um die Verstärkung weiter zu erhöhen, könnte man in zukünftigen Experimenten versuchen, das hier vorgestellte Dimer-System zusätzlich in die Nanokavität hoher Güte einzubringen (vgl. Kap. 4.3). Die Dimere würden dann durch das verstärkte Feld im Resonator angeregt. Dies würde wiederum zu einem noch stärkeren Nahfeld im Gap führen, welches dann die Moleküle zur verstärkten Raman-Emission anregen könnte.

Anhand der ausgewählten Projekte konnte gezeigt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute konfokale Raman-Spektrometer sich sowohl durch eine hohe Empfindlichkeit als auch durch eine flexible Anpassung an unterschiedliche Messbedingungen auszeichnet. Dies ermöglicht die Betrachtung verschiedenster Fragestellungen in diversen Themengebieten, von der Medizin bis hin zur Plasmonik.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Huser, für die Vergabe eines spannenden Themas und die hilfreiche Unterstützung mit zahlreichen Diskussionen während der Forschungszeit danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Zweitkorrektor Prof. Dr. Dario Anselmetti für die gute Kooperation in verschiedenen Projekten bedanken und dafür, dass er sich freundlicherweise für den wissenschaftlichen Austausch genommen hat.

Mein besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. Andreas Hütten und Prof. Dr. Nicolas Borghini, dass sie sich bereit erklärt haben, der Prüfungskommission beizutreten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Gerd Wiebusch für die Hilfe beim Aufbau des Raman-Systems, die zielführenden Diskussionen und die Hilfe bei allen möglichen anderen Problemen bedanken.

Meinen Kollegen danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft! Ein herzlicher Dank geht vor allem an Christian Pilger für die Stunden, die er ins kritische Lesen meiner Arbeit investiert hat. Mein aufrichtiger Dank gebührt ebenfalls Dr. Wolfgang Hübner, Viola Mönkemöller, Henning Hachmeister und Ramsia Sreji für ihren unterstützenden und motivierenden Beistand.

Bedanken möchte ich mich auch bei unseren Kooperationspartnern für die Probenbereitstellung und die ergänzende Charakterisierung: Dr. Alexey Chizhik, Dr. Andreas Winter, Emanuel Marschewski, Dr. Volker Walhorn, Roland Hillmann, Dr. Ingo Heesemann, Dr. Matthias Hensen, Daniel Jäger und Jens Vogt.

Last but not least danke ich Dr. Dominik Differt und meiner Familie.

7 Literaturverzeichnis

- [1] K. Kong, C. Kendall, N. Stone, und I. Notinghamer, „Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection“, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Bd. 89, S. 121–134, Juli 2015.
- [2] N. Dwivedi, N. Satyanarayana, R. J. Yeo, H. Xu, K. Ping Loh, S. Tripathy, und C. S. Bhatia, „Ultrathin Carbon with Interspersed Graphene/Fullerene-like Nanostructures: A Durable Protective Overcoat for High Density Magnetic Storage“, *Sci. Rep.*, Bd. 5, S. 11607, Juni 2015.
- [3] P. J. M. Bhumika D. Patel, „An Overview: Application of Raman Spectroscopy in Pharmaceutical Field“, *Curr. Pharm. Anal.*, Bd. 6, Nr. 2, S. 131–141, 2010.
- [4] F. Rull Perez, H. G. M. Edwards, A. Rivas, und L. Drummond, „Fourier transform Raman spectroscopic characterization of pigments in the mediaeval frescoes at Convento de la Peregrina, Sahagun, Léon, Spain. Part 1 — preliminary study“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 30, Nr. 4, S. 301–305, Apr. 1999.
- [5] W. Bechmann und J. Schmidt, *Struktur- und Stoffanalytik mit spektroskopischen Methoden*. Springer-Verlag, 2013.
- [6] J. R. Ferraro und K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, 2012.
- [7] C. V. Raman und K. S. Krishnan, „A New Type of Secondary Radiation“, *Nature*, Bd. 121, S. 501–502, 1928.
- [8] R. Smith, K. L. Wright, und L. Ashton, „Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies“, *Analyst*, Bd. 141, Nr. 12, S. 3590–3600, Juni 2016.
- [9] T. Jue, *Biomedical Applications of Biophysics*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [10] E. Smith und G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. John Wiley & Sons, 2013.
- [11] K. C. Bantz, A. F. Meyer, N. J. Wittenberg, H. Im, Ö. Kurtuluş, S. H. Lee, N. C. Lindquist, S.-H. Oh, und C. L. Haynes, „Recent Progress in SERS Biosensing“, *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP*, Bd. 13, Nr. 24, S. 11551–11567, Juni 2011.
- [12] C. Andreou, R. Mirsafavi, M. Moskovits, und C. D. Meinhart, „Detection of low concentrations of ampicillin in milk“, *Analyst*, Bd. 140, Nr. 15, S. 5003–5005, Juli 2015.
- [13] E. C. Le Ru, M. Meyer, und P. G. Etchegoin, „Proof of Single-Molecule Sensitivity in Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) by Means of a Two-Analyte Technique“, *J. Phys. Chem. B*, Bd. 110, Nr. 4, S. 1944–1948, Feb. 2006.
- [14] „<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.“ 15-Apr-2016.
- [15] T. Bartel, *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie: Technik, Klinik, Therapie ; mit 194 Tabellen*. Schattauer Verlag, 2001.
- [16] J. M. Schmitt, „Optical coherence tomography (OCT): a review“, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, Bd. 5, Nr. 4, S. 1205–1215, Juli 1999.

- [17] S. E. Nissen und P. Yock, „Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications“, *Circulation*, Bd. 103, Nr. 4, S. 604–616, Jan. 2001.
- [18] V. Wesselak, T. Schabbach, T. Link, und J. Fischer, *Regenerative Energietechnik*. Springer-Verlag, 2013.
- [19] M. Kaltschmitt, H. Hartmann, und H. Hofbauer, *Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren*. Springer-Verlag, 2016.
- [20] S. Geitmann, *Erneuerbare Energien: Mit neuer Energie in die Zukunft*. Hydrogeit Verlag, 2010.
- [21] W. B. Caldwell, K. Chen, B. R. Herr, C. A. Mirkin, J. C. Hulteen, und R. P. Van Duyne, „Self-Assembled Monolayers of Ferrocenylazobenzenes on Au(111)/Mica Films: Surface-Enhanced Raman Scattering Response vs Surface Morphology“, *Langmuir*, Bd. 10, Nr. 11, S. 4109–4115, Nov. 1994.
- [22] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, und R. P. Van Duyne, „Surface-enhanced Raman spectroscopy“, *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif*, Bd. 1, S. 601–626, 2008.
- [23] E. L. Ru und P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and related plasmonic effects*. Elsevier, 2008.
- [24] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, und M. S. Feld, „Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)“, *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 78, Nr. 9, S. 1667–1670, März 1997.
- [25] K. M. Dorney, I. E. P. Sizemore, T. Alqahtani, N. C. Adragna, und P. K. Lauf, „Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) tracking of chelerythrine, a Na(+)/K(+) pump inhibitor, into cytosol and plasma membrane fractions of human lens epithelial cell cultures“, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, Bd. 32, Nr. 7, S. 146–156, 2013.
- [26] L. A. Lane, X. Qian, und S. Nie, „SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging“, *Chem. Rev.*, Bd. 115, Nr. 19, S. 10489–10529, Okt. 2015.
- [27] B. Kowalczyk, I. Lagzi, und B. A. Grzybowski, „Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles“, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, Bd. 16, Nr. 2, S. 135–148, Apr. 2011.
- [28] P. Larkin, *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, 2011.
- [29] A. Smekal, „Zur Quantentheorie der Dispersion“, *Naturwissenschaften*, Bd. 11, Nr. 43, S. 873–875, Okt. 1923.
- [30] G. Turrell und J. Corset, *Raman Microscopy: Developments and Applications*. Academic Press, 1996.
- [31] J. Brandmüller und H. Moser, *Einführung in die Ramanspektroskopie*. Springer-Verlag, 2013.
- [32] K. W. F. Kohlrausch, *Der Smekal-Raman-Effekt: Ergänzungsband 1931–1937*. Springer-Verlag, 2013.

- [33] G. B. Wright, *Light Scattering Spectra of Solids: Proceedings of the International Conference on Light Scattering Spectra of Solids held at: New York University, New York September 3, 4, 5, 6, 1968*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [34] C. Mallidis, V. Sanchez, J. Wistuba, F. Wuebbeling, M. Burger, C. Fallnich, und S. Schlatt, „Raman microspectroscopy: shining a new light on reproductive medicine“, *Hum. Reprod. Update*, Bd. 20, Nr. 3, S. 403–414, Juni 2014.
- [35] R. Helm, „Invitation to Organic Chemistry (Johnson, A. William)“, *J. Chem. Educ.*, Bd. 77, Nr. 4, S. 449, Apr. 2000.
- [36] L. Xin, *Organic Semiconductor Lasers and Tailored Nanostructures for Raman Spectroscopy*. KIT Scientific Publishing, 2015.
- [37] S. Liedtke und J. Popp, *Laser, Licht und Leben: Techniken in der Medizin*. John Wiley & Sons, 2012.
- [38] L. Bergmann, T. Dorfmueller, und C. Schaefer, *Lehrbuch der Experimentalphysik: Gase, Nanosysteme, Flüssigkeiten: [51 Tabellen] / Hrsg. Karl Kleinermanns. Autoren Thomas Dorfmueller ...* Walter de Gruyter, 2005.
- [39] H. P. Buschman, G. Deinum, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, A. van der Laarse, A. V. Brusckke, und M. S. Feld, „Raman microspectroscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ“, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, Bd. 10, Nr. 2, S. 69–82, Apr. 2001.
- [40] S. Fore, J. Chan, D. Taylor, und T. Huser, „Raman spectroscopy of individual monocytes reveals that single-beam optical trapping of mononuclear cells occurs by their nucleus“, *J. Opt. 2010*, Bd. 13, Nr. 4, S. 44021, 2011.
- [41] M. D. Sonntag, E. A. Pozzi, N. Jiang, M. C. Hersam, und R. P. Van Duyne, „Recent Advances in Tip-Enhanced Raman Spectroscopy“, *J. Phys. Chem. Lett.*, Bd. 5, Nr. 18, S. 3125–3130, Sep. 2014.
- [42] D. Wei, S. Chen, und Q. Liu, „Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy“, *Appl. Spectrosc. Rev.*, Bd. 50, Nr. 5, S. 387–406, Mai 2015.
- [43] D. A. Shea und M. D. Morris, „Bone Tissue Fluorescence Reduction for Visible Laser Raman Spectroscopy“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 56, Nr. 2, S. 182–186, Feb. 2002.
- [44] W. Zinth und U. Zinth, *Optik: Lichtstrahlen - Wellen - Photonen*. Walter de Gruyter, 2013.
- [45] S. Asher und C. Johnson, „Raman spectroscopy of a coal liquid shows that fluorescence interference is minimized with ultraviolet excitation“, *Science*, Bd. 225, Nr. 4659, S. 311–313, Juli 1984.
- [46] Q. Wu, G. Balakrishnan, A. Pevsner, und T. G. Spiro, „Histidine Photodegradation during UV Resonance Raman Spectroscopy“, *J. Phys. Chem. A*, Bd. 107, Nr. 40, S. 8047–8051, Okt. 2003.
- [47] C. Xie, M. A. Dinno, und Y. Li, „Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells“, *Opt. Lett.*, Bd. 27, Nr. 4, S. 249, Feb. 2002.
- [48] J. D. Handen und I. K. Lednev, „Deep UV Resonance Raman Spectroscopy for Characterizing Amyloid Aggregation“, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, Bd. 1345, S. 89–100, 2016.

- [49] L. Ashton, C. E. M. Hogwood, A. S. Tait, J. Kuligowski, C. M. Smales, D. G. Bracewell, A. J. Dickson, and R. Goodacre, „UV resonance Raman spectroscopy: a process analytical tool for host cell DNA and RNA dynamics in mammalian cell lines: UV resonance Raman spectroscopy for DNA analysis of mammalian cell culture“, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Bd. 90, Nr. 2, S. 237–243, Feb. 2015.
- [50] I. D. Wolf, „Micro-Raman spectroscopy to study local mechanical stress in silicon integrated circuits“, *Semicond. Sci. Technol.*, Bd. 11, Nr. 2, S. 139, 1996.
- [51] K. Klein, A. M. Gigler, T. Aschenbrenner, R. Monetti, W. Bunk, F. Jamitzky, G. Morfill, R. W. Stark, and J. Schlegel, „Label-Free Live-Cell Imaging with Confocal Raman Microscopy“, *Biophys. J.*, Bd. 102, Nr. 2, S. 360–368, Jan. 2012.
- [52] D. B. Murphy und M. W. Davidson, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. John Wiley & Sons, 2012.
- [53] B. C. Wilson, V. V. Tuchin, und S. Tanev, *Advances in Biophotonics*. IOS Press, 2005.
- [54] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, und S. Chu, „Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles“, *Opt. Lett.*, Bd. 11, Nr. 5, S. 288, Mai 1986.
- [55] M. R. K. Mofrad und R. D. Kamm, *Cytoskeletal Mechanics: Models and Measurements in Cell Mechanics*. Cambridge University Press, 2006.
- [56] M. P. Lee, A. Curran, G. M. Gibson, M. Tassieri, N. R. Heckenberg, und M. J. Padgett, „Optical shield: measuring viscosity of turbid fluids using optical tweezers“, *Opt. Express*, Bd. 20, Nr. 11, S. 12127–12132, Mai 2012.
- [57] A. Ashkin, „Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime“, *Biophys. J.*, Bd. 61, Nr. 2, S. 569–582, Feb. 1992.
- [58] R. Hillmann, „Diplomarbeit“.
- [59] W. H. Wright, G. J. Sonek, und M. W. Berns, „Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers“, *Appl. Opt.*, Bd. 33, Nr. 9, S. 1735–1748, März 1994.
- [60] K. C. Neuman und S. M. Block, „Optical trapping“, *Rev. Sci. Instrum.*, Bd. 75, Nr. 9, S. 2787–2809, Sep. 2004.
- [61] A. P. Shreve, N. J. Cherepy, und R. A. Mathies, „Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 46, Nr. 4, S. 707–711, Apr. 1992.
- [62] J. Zhao, M. M. Carrabba, und F. S. Allen, „Automated Fluorescence Rejection Using Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 56, Nr. 7, S. 834–845, Juli 2002.
- [63] P. Matousek, M. Towrie, und A. W. Parker, „Simple Reconstruction Algorithm for Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 59, Nr. 6, S. 848–851, Juni 2005.
- [64] A. C. De Luca, M. Mazilu, A. Riches, C. S. Herrington, und K. Dholakia, „Online Fluorescence Suppression in Modulated Raman Spectroscopy“, *Anal. Chem.*, Bd. 82, Nr. 2, S. 738–745, Jan. 2010.

- [65] P. A. Mosier-Boss, S. H. Lieberman, und R. Newbery, „Fluorescence Rejection in Raman Spectroscopy by Shifted-Spectra, Edge Detection, and FFT Filtering Techniques“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 49, Nr. 5, S. 630–638, Mai 1995.
- [66] M. T. Gebrekidan, C. Knipfer, F. Stelzle, J. Popp, S. Will, und A. Braeuer, „A shifted-excitation Raman difference spectroscopy (SERDS) evaluation strategy for the efficient isolation of Raman spectra from extreme fluorescence interference“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 47, Nr. 2, S. 198–209, Feb. 2016.
- [67] B. B. Praveen, M. Mazilu, R. F. Marchington, C. S. Herrington, A. Riches, und K. Dholakia, „Optimisation of Wavelength Modulated Raman Spectroscopy: Towards High Throughput Cell Screening“, *PLOS ONE*, Bd. 8, Nr. 6, S. e67211, Juni 2013.
- [68] I. Gannot, I. Ron, F. Hekmat, V. Chernomordik, und A. Gandjbakhche, „Functional optical detection based on pH dependent fluorescence lifetime“, *Lasers Surg. Med.*, Bd. 35, Nr. 5, S. 342–348, 2004.
- [69] P. Matousek, M. Towrie, A. Stanley, und A. W. Parker, „Efficient Rejection of Fluorescence from Raman Spectra Using Picosecond Kerr Gating“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 53, Nr. 12, S. 1485–1489, Dez. 1999.
- [70] F. Knorr, Z. J. Smith, und S. Wachsmann-Hogiu, „Development of a time-gated system for Raman spectroscopy of biological samples“, *Opt. Express*, Bd. 18, Nr. 19, S. 20049, Sep. 2010.
- [71] A. Zumbusch, G. R. Holtom, und X. S. Xie, „Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering“, *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 82, Nr. 20, S. 4142–4145, Mai 1999.
- [72] A. C. De Luca, P. Reader-Harris, M. Mazilu, S. Mariggìo, D. Corda, und A. Di Falco, „Reproducible Surface-Enhanced Raman Quantification of Biomarkers in Multicomponent Mixtures“, *ACS Nano*, Bd. 8, Nr. 3, S. 2575–2583, März 2014.
- [73] B. B. Praveen, P. C. Ashok, M. Mazilu, A. Riches, S. Herrington, und K. Dholakia, „Fluorescence suppression using wavelength modulated Raman spectroscopy in fiber-probe-based tissue analysis“, *J. Biomed. Opt.*, Bd. 17, Nr. 7, S. 77006, Juli 2012.
- [74] Z.-M. Zhang, S. Chen, Y.-Z. Liang, Z.-X. Liu, Q.-M. Zhang, L.-X. Ding, F. Ye, und H. Zhou, „An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 41, Nr. 6, S. 659–669, Juni 2010.
- [75] C. A. Lieber und A. Mahadevan-Jansen, „Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 57, Nr. 11, S. 1363–1367, Nov. 2003.
- [76] C. Camerlingo, F. Zenone, G. M. Gaeta, R. Riccio, und M. Lepore, „Wavelet data processing of micro-Raman spectra of biological samples“, *Meas. Sci. Technol.*, Bd. 17, Nr. 2, S. 298, 2006.
- [77] J. Zhao, H. Lui, D. I. McLean, und H. Zeng, „Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 61, Nr. 11, S. 1225–1232, Nov. 2007.
- [78] D. Kealey und P. J. Haines, *BIOS Instant Notes in Analytical Chemistry*. Garland Science, 2002.

- [79] H. Siebert, *Anwendungen der Schwingungsspektroskopie in der Anorganischen Chemie*. Springer-Verlag, 2013.
- [80] P. Atkins und J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*. OUP Oxford, 2014.
- [81] N. Kumar, S. J. Spencer, D. Imbraguglio, A. M. Rossi, A. J. Wain, B. M. Weckhuysen, und D. Roy, „Extending the plasmonic lifetime of tip-enhanced Raman spectroscopy probes“, *Phys Chem Chem Phys*, Bd. 18, Nr. 19, S. 13710–13716, 2016.
- [82] A. C. Faucett und J. M. Mativetsky, „Nanoscale reduction of graphene oxide under ambient conditions“, *Carbon*, Bd. 95, S. 1069–1075, Dez. 2015.
- [83] S. Mignuzzi, N. Kumar, B. Brennan, I. S. Gilmore, D. Richards, A. J. Pollard, und D. Roy, „Probing individual point defects in graphene via near-field Raman scattering“, *Nanoscale*, Bd. 7, Nr. 46, S. 19413–19418, Nov. 2015.
- [84] D. Kourouski, T. Postiglione, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, und I. K. Lednev, „Amide I vibrational mode suppression in surface (SERS) and tip (TERS) enhanced Raman spectra of protein specimens“, *The Analyst*, Bd. 138, Nr. 6, S. 1665–1673, März 2013.
- [85] M. Thomas, S. Mühlig, T. Deckert-Gaudig, C. Rockstuhl, V. Deckert, und P. Marquetand, „Distinguishing chemical and electromagnetic enhancement in surface-enhanced Raman spectra: The case of para-nitrothiophenol“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 44, Nr. 11, S. 1497–1505, Nov. 2013.
- [86] P. Buzzini, G. Massonnet, und F. Monard Sermier, „The micro Raman analysis of paint evidence in criminalistics: case studies“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 37, Nr. 9, S. 922–931, Sep. 2006.
- [87] U. Schmidt, S. Hild, W. Ibach, und O. Hollricher, „Characterization of Thin Polymer Films on the Nanometer Scale with Confocal Raman AFM“, *Macromol. Symp.*, Bd. 230, Nr. 1, S. 133–143, Dez. 2005.
- [88] K. M. Marzec, T. P. Wrobel, A. Rygula, E. Maslak, A. Jaształ, A. Fedorowicz, S. Chlopicki, und M. Baranska, „Visualization of the biochemical markers of atherosclerotic plaque with the use of Raman, IR and AFM“, *J. Biophotonics*, Bd. 7, Nr. 9, S. 744–756, Sep. 2014.
- [89] R. Mukhopadhyay, „Raman flexes its muscles“, *Anal. Chem.*, Bd. 79, Nr. 9, S. 3265–3270, Mai 2007.
- [90] G. A. Reider, *Photonik: Eine Einführung in die Grundlagen*. Springer-Verlag, 2013.
- [91] E. Fällman und O. Axner, „Design for fully steerable dual-trap optical tweezers“, *Appl. Opt.*, Bd. 36, Nr. 10, S. 2107, Apr. 1997.
- [92] T. A. Pologruto, B. L. Sabatini, und K. Svoboda, „ScanImage: Flexible software for operating laser scanning microscopes“, *Biomed. Eng. OnLine*, Bd. 2, S. 13, 2003.
- [93] D. C. Harris, *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Springer-Verlag, 2014.
- [94] K. Ramser, K. Logg, M. Goksör, J. Enger, M. Käll, und D. Hanstorp, „Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes“, *J. Biomed. Opt.*, Bd. 9, Nr. 3, S. 593–600, Juni 2004.

- [95] K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, und S. M. Block, „Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps“, *Biophys. J.*, Bd. 77, Nr. 5, S. 2856–2863, Nov. 1999.
- [96] C. S. S. R. Kumar, *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [97] B. Torbett, D. S. Goodsell, und D. Richman, *The Future of HIV-1 Therapeutics: Resistance Is Futile?* Springer, 2015.
- [98] M. Monti, M. Zanoni, A. Calligaro, M. S. H. Ko, P. Mauri, und C. A. Redi, „Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes“, *Biol. Reprod.*, Bd. 88, Nr. 1, S. 2, Jan. 2013.
- [99] Z.-W. Wang, G.-L. Zhang, H. Schatten, J. Carroll, und Q.-Y. Sun, „Cytoplasmic Determination of Meiotic Spindle Size Revealed by a Unique Inter-Species Germinal Vesicle Transfer Model“, *Sci. Rep.*, Bd. 6, Jan. 2016.
- [100] Z. Polanski, S. Hoffmann, und C. Tsurumi, „Oocyte nucleus controls progression through meiotic maturation“, *Dev. Biol.*, Bd. 281, Nr. 2, S. 184–195, Mai 2005.
- [101] W. Buselmaier und G. Tariverdian, *Humangenetik für Biologen*. Springer-Verlag, 2005.
- [102] L. Nolte, „Masterarbeit“.
- [103] K. P. F.R.S., „LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space“, *Philos. Mag. Ser. 6*, Bd. 2, Nr. 11, S. 559–572, Nov. 1901.
- [104] J. E. Gentle, *Matrix Algebra: Theory, Computations, and Applications in Statistics*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [105] H. Stoyan und U. Jansen, *Umweltstatistik: Statistische Verarbeitung und Analyse von Umweltdaten*. Springer-Verlag, 2013.
- [106] W. Gerok, *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Schattauer Verlag, 2007.
- [107] M. Thelen und N. Abegunewardene, *Bildgebende Kardiagnostik: mit MRT, CT, Echokardiographie und anderen Verfahren ; 61 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, 2010.
- [108] M. Epple und P. Lanzer, „How much interdisciplinarity is required to understand vascular calcifications? Formulation of four basic principles of vascular calcification“, *Z. Für Kardiologie*, Bd. 90 Suppl 3, S. 2–5, 2001.
- [109] H. Pasch und W. Schrepp, *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [110] E. H. Seeley und R. M. Caprioli, „Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Sep. 2008.
- [111] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, und J. Gile, „Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS“, *Anal. Chem.*, Bd. 69, Nr. 23, S. 4751–4760, Dez. 1997.
- [112],http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_1/MuscularArtery01.jpg“. 03-März-2016.

- [113] J. Zervos-Kopp, *Anatomie, Biologie und Physiologie: Ergotherapie Prüfungswissen*. Georg Thieme Verlag, 2013.
- [114] A. Machraoui, P. Grewe, und A. Fischer, *Koronarstenting: Werkstofftechnik, Pathomorphologie, Therapie*. Springer-Verlag, 2013.
- [115] M. Naghavi, *Asymptomatic Atherosclerosis: Pathophysiology, Detection and Treatment*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [116] R. Ross, „Atherosclerosis--an inflammatory disease“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 340, Nr. 2, S. 115–126, Jan. 1999.
- [117] V. Fuster, E. J. Topol, und E. G. Nabel, *Atherothrombosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [118] R. Ross, „The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s“, *Nature*, Bd. 362, Nr. 6423, S. 801–809, Apr. 1993.
- [119] I. Kuhlmann, D. Chin, und G. Rimbach, *Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und Atherosklerose*. Springer-Verlag, 2015.
- [120] „<http://www.webmd.com/heart-disease/video/atherosclerosis>“. 04-Mai-2016.
- [121] D. P. Ramji und T. S. Davies, „Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets“, *Cytokine Growth Factor Rev.*, Bd. 26, Nr. 6, S. 673–685, Dez. 2015.
- [122] D. Anz, *Biomarker*. Schattauer Verlag, 2008.
- [123] J. Hallbach, *Klinische Chemie und Hämatologie: Biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*. Georg Thieme Verlag, 2011.
- [124] H. C. Stary, A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, und R. W. Wissler, „A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association“, *Circulation*, Bd. 89, Nr. 5, S. 2462–2478, Mai 1994.
- [125] M. J. Davies, „Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995“, *Circulation*, Bd. 94, Nr. 8, S. 2013–2020, Okt. 1996.
- [126] E. J. Topol, *Acute Coronary Syndromes, Third Edition*. CRC Press, 2000.
- [127] D. Proudfoot, J. N. Skepper, L. Hegyi, M. R. Bennett, C. M. Shanahan, und P. L. Weissberg, „Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies“, *Circ. Res.*, Bd. 87, Nr. 11, S. 1055–1062, Nov. 2000.
- [128] G. V. Nogueira, L. Silveira, A. A. Martin, R. A. Zângaro, M. T. T. Pacheco, M. C. Chavantes, und C. A. Pasqualucci, „Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery“, *J. Biomed. Opt.*, Bd. 10, Nr. 3, S. 31117, Juni 2005.
- [129] E. U. Otero, S. Sathaiyah, L. Silveira, P. M. A. Pomerantzeff, C. A. G. Pasqualucci, und alves, „Raman spectroscopy for diagnosis of calcification in human heart valves“, *J. Spectrosc.*, Bd. 18, Nr. 1, S. 75–84, 2004.
- [130] R. E. Harris, *Epidemiology of Chronic Disease*. Jones & Bartlett Publishers, 2013.

- [131] P. Libby, U. Schoenbeck, F. Mach, A. P. Selwyn, und P. Ganz, „Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization“, *Am. J. Med.*, Bd. 104, Nr. 2A, S. 14S–18S, Feb. 1998.
- [132] T. Nikolaus, *Klinische Geriatrie*. Springer-Verlag, 2013.
- [133] C. K. Glass und J. L. Witztum, „Atherosclerosis. the road ahead“, *Cell*, Bd. 104, Nr. 4, S. 503–516, Feb. 2001.
- [134] G. Pasterkamp, E. Falk, H. Woutman, und C. Borst, „Techniques characterizing the coronary atherosclerotic plaque: influence on clinical decision making?“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 36, Nr. 1, S. 13–21, Juli 2000.
- [135] P. D. J. Fujimoto und P. D. W. Drexler, „Introduction to Optical Coherence Tomography“, in *Optical Coherence Tomography*, P. D. W. Drexler und P. D. J. G. Fujimoto, Hrsg. Springer Berlin Heidelberg, 2008, S. 1–45.
- [136] „<http://www.intechopen.com/books/coronary-artery-disease-assessment-surgery-prevention/optical-coherence-tomography-for-the-assessment-of-coronary-plaque-vulnerability>“. 17-Feb-2016.
- [137] F. Prati, E. Regar, G. S. Mintz, E. Arbustini, C. Di Mario, I.-K. Jang, T. Akasaka, M. Costa, G. Guagliumi, E. Grube, Y. Ozaki, F. Pinto, P. W. J. Serruys, und Expert’s OCT Review Document, „Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis“, *Eur. Heart J.*, Bd. 31, Nr. 4, S. 401–415, Feb. 2010.
- [138] G. Lang, *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag, 2012.
- [139] J. L. Suhaim, C.-Y. Chung, M. B. Lilledahl, R. S. Lim, M. Levi, B. J. Tromberg, und E. O. Potma, „Characterization of cholesterol crystals in atherosclerotic plaques using stimulated Raman scattering and second-harmonic generation microscopy“, *Biophys. J.*, Bd. 102, Nr. 8, S. 1988–1995, Apr. 2012.
- [140] M. Reichenbacher und J. Popp, *Strukturanalytik organischer und anorganischer Verbindungen: Ein Übungsbuch*. Springer-Verlag, 2008.
- [141] M. Lalowski, F. Magni, V. Mainini, E. Monogioudi, A. Gotsopoulos, R. Soliymani, C. Chinello, und M. Baumann, „Imaging mass spectrometry: a new tool for kidney disease investigations“, *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, Bd. 28, Nr. 7, S. 1648–1656, Juli 2013.
- [142] M. Martin-Lorenzo, B. Balluff, A. S. Maroto, R. J. Carreira, R. J. M. van Zeijl, L. Gonzalez-Calero, F. de la Cuesta, M. G. Barderas, L. F. Lopez-Almodovar, L. R. Padial, L. A. McDonnell, F. Vivanco, und G. Alvarez-Llamas, „Lipid and protein maps defining arterial layers in atherosclerotic aorta“, *Data Brief*, Bd. 4, S. 328–331, Sep. 2015.
- [143] N. Zaima, T. Sasaki, H. Tanaka, X. W. Cheng, K. Onoue, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, H. Enomoto, N. Unno, M. Kuzuya, und M. Setou, „Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions“, *Atherosclerosis*, Bd. 217, Nr. 2, S. 427–432, Aug. 2011.
- [144] U. Welsch, *Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; 15 Tabellen*. Elsevier, Urban&FischerVerlag, 2005.

- [145] E. O. Faoláin, M. B. Hunter, J. M. Byrne, P. Kelehan, H. A. Lambkin, H. J. Byrne, und F. M. Lyng, „Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, Bd. 53, Nr. 1, S. 121–129, Jan. 2005.
- [146] C. A. Burtis und D. E. Bruns, *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Health Sciences, 2014.
- [147] G. R. Turbett und L. N. Sellner, „The use of optimal cutting temperature compound can inhibit amplification by polymerase chain reaction“, *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B*, Bd. 6, Nr. 5, S. 298–303, Okt. 1997.
- [148] M. G. Shim und B. C. Wilson, „The Effects of ex vivo Handling Procedures on the Near-Infrared Raman Spectra of Normal Mammalian Tissues“, *Photochem. Photobiol.*, Bd. 63, Nr. 5, S. 662–671, Mai 1996.
- [149] J. Vogt, „Masterarbeit“.
- [150] H. Bednarz, J. Vogt, M. Giampa, J. Kölling, T. Nattkemper, U. Kellner, C. Pilger, H. Hachmeister, E. Oberlander, H. Milting, T. Huser, und C. Niehaus, „Multimodal Imaging of Atherosclerotic Plaques: Mass Spectrometry Imaging (MSI) and Nonlinear Optical Microscopy as a Tool in Biomedical Biomarker Discovery“, *Vorbereit.*
- [151] R. L. Frost, R. Scholz, A. López, und Y. Xi, „A vibrational spectroscopic study of the phosphate mineral whiteite $\text{CaMn(++)Mg}_2\text{Al}_2(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$ “, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, Bd. 124, S. 243–248, Apr. 2014.
- [152] J. J. Baraga, M. S. Feld, und R. P. Rava, „Detection of Atherosclerosis in Human Artery by Mid-Infrared Attenuated Total Reflectance“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 709–711, Apr. 1991.
- [153] R. Tuma, „Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 36, Nr. 4, S. 307–319, Apr. 2005.
- [154] A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarthy, M. Epple, M. Neumann, C. M. Shanahan, und D. Proudfoot, „Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization“, *Circ. Res.*, Bd. 103, Nr. 5, S. e28-34, Aug. 2008.
- [155] A. Farb, A. P. Burke, A. L. Tang, T. Y. Liang, P. Mannan, J. Smialek, und R. Virmani, „Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death“, *Circulation*, Bd. 93, Nr. 7, S. 1354–1363, Apr. 1996.
- [156] J. W. Chan, D. Motton, J. C. Rutledge, N. L. Keim, und T. Huser, „Raman Spectroscopic Analysis of Biochemical Changes in Individual Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Pre- and Postprandial State“, *Anal. Chem.*, Bd. 77, Nr. 18, S. 5870–5876, Sep. 2005.
- [157] A. Lattermann, C. Matthäus, N. Bergner, C. Beleites, B. F. Romeike, C. Krafft, B. R. Brehm, und J. Popp, „Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging“, *J. Biophotonics*, Bd. 6, Nr. 1, S. 110–121, Jan. 2013.

- [158] P. W. Siri-Tarino, Q. Sun, F. B. Hu, and R. M. Krauss, „Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients“, *Curr. Atheroscler. Rep.*, Bd. 12, Nr. 6, S. 384–390, Nov. 2010.
- [159] H. Itabe, T. Obama, R. Kato, H. Itabe, T. Obama, und R. Kato, „The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis, The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis“, *J. Lipids J. Lipids*, Bd. 2011, 2011, S. e418313, Mai 2011.
- [160] A. Bonetti, A. Bonifacio, A. D. Mora, U. Livi, M. Marchini, und F. Ortolani, „Carotenoids Co-Localize with Hydroxyapatite, Cholesterol, and Other Lipids in Calcified Stenotic Aortic Valves. Ex Vivo Raman Maps Compared to Histological Patterns“, *Eur. J. Histochem. EJH*, Bd. 59, Nr. 2, Apr. 2015.
- [161] D. H. BLANKENHORN, „THE INFILTRATION OF CAROTENOIDS INTO HUMAN ATHEROMAS AND XANTHOMAS*“, *Ann. Intern. Med.*, Bd. 53, Nr. 5, S. 944–954, Nov. 1960.
- [162] A. Dogariu, A. Goltsov, H. Xia, und M. O. Scully, „Concentration dependence in coherent Raman scattering“, *J. Mod. Opt.*, Bd. 55, Nr. 19–20, S. 3255–3261, Nov. 2008.
- [163] E. O. Potma, C. L. Evans, und X. S. Xie, „Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging“, *Opt. Lett.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 241, Jan. 2006.
- [164] W. Schlumberger, M. Thie, J. Rauterberg, und H. Robenek, „Collagen synthesis in cultured aortic smooth muscle cells. Modulation by collagen lattice culture, transforming growth factor-beta 1, and epidermal growth factor“, *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol. Am. Heart Assoc.*, Bd. 11, Nr. 6, S. 1660–1666, Dez. 1991.
- [165] P. Campagnola, „Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics“, *Anal. Chem.*, Bd. 83, Nr. 9, S. 3224–3231, Mai 2011.
- [166] M. D. Rekhter, „Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 41, Nr. 2, S. 376–384, Feb. 1999.
- [167] S.-H. Kim, E.-S. Lee, J. Y. Lee, E. S. Lee, B.-S. Lee, J. E. Park, und D. W. Moon, „Multiplex coherent anti-stokes Raman spectroscopy images intact atheromatous lesions and concomitantly identifies distinct chemical profiles of atherosclerotic lipids“, *Circ. Res.*, Bd. 106, Nr. 8, S. 1332–1341, Apr. 2010.
- [168] R. S. Lim, J. L. Suhalim, S. Miyazaki-Anzai, M. Miyazaki, M. Levi, E. O. Potma, und B. J. Tromberg, „Identification of cholesterol crystals in plaques of atherosclerotic mice using hyperspectral CARS imaging“, *J. Lipid Res.*, Bd. 52, Nr. 12, S. 2177–2186, Dez. 2011.
- [169] C. Zhang, D. Zhang, und J.-X. Cheng, „Coherent Raman Scattering Microscopy in Biology and Medicine“, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 415–445, 2015.
- [170] B. R. Amann-Vesti, *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, 2006.
- [171] T. Bührke und R. Wengenmayr, *Erneuerbare Energie: Konzepte für die Energiewende*. John Wiley & Sons, 2012.
- [172] M. Hannon, J. Gimpel, M. Tran, B. Rasala, und S. Mayfield, „Biofuels from algae: challenges and potential“, *Biofuels*, Bd. 1, Nr. 5, S. 763–784, Sep. 2010.

- [173] K. Bay, *Biodiesel: hoch siedendes Absorbens für die Abluftreinigung*. Cuvillier Verlag, 2007.
- [174] L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, und M. R. Tredici, „Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor“, *Biotechnol. Bioeng.*, Bd. 102, Nr. 1, S. 100–112, Jan. 2009.
- [175] P. Präve, U. Faust, W. Sittig, und D. A. Sukatsch, *Handbuch der Biotechnologie*. Oldenbourg Industrieverlag, 1994.
- [176] M. A. Borowitzka, „Algal biotechnology products and processes — matching science and economics“, *J. Appl. Phycol.*, Bd. 4, Nr. 3, S. 267–279, Sep. 1992.
- [177] M. Garrett, *Encyclopedia of Transportation: Social Science and Policy*. SAGE Publications, 2014.
- [178] C. Bogen, A. Al-Dilaimi, A. Albersmeier, J. Wichmann, M. Grundmann, O. Rupp, K. J. Lauersen, O. Blifernez-Klassen, J. Kalinowski, A. Goesmann, J. H. Mussnug, und O. Kruse, „Reconstruction of the lipid metabolism for the microalga *Monoraphidium neglectum* from its genome sequence reveals characteristics suitable for biofuel production“, *BMC Genomics*, Bd. 14, S. 926, 2013.
- [179] R. D. Schmid, *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. John Wiley & Sons, 2016.
- [180] F. Horn, *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag, 2009.
- [181] H. Schneemann und G. Wurm, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 1: Waren und Dienste*. Springer-Verlag, 2013.
- [182] W. F. Ganong, *Medizinische Physiologie: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie des Menschen für Studierende der Medizin und Ärzte*. Springer-Verlag, 2013.
- [183] „<http://image.slidesharecdn.com/objective6-110923180800-phpapp02/95/objective-6-basic-functions-and-properties-of-lipids-4-728.jpg?cb=1316803982>“. 03-Mai-2016.
- [184] O. Kayser und N. Aversch, *Technische Biochemie: Die Biochemie und industrielle Nutzung von Naturstoffen*. Springer-Verlag, 2015.
- [185] R. Ebermann und I. Elmadfa, *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. Springer-Verlag, 2008.
- [186] N. A. Ducharme und P. E. Bickel, „Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis“, *Endocrinology*, Bd. 149, Nr. 3, S. 942–949, März 2008.
- [187] S. Martin und R. G. Parton, „Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 7, Nr. 5, S. 373–378, Mai 2006.
- [188] H. Goold, F. Beisson, G. Peltier, und Y. Li-Beisson, „Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions“, *Plant Cell Rep.*, Bd. 34, Nr. 4, S. 545–555, Nov. 2014.
- [189] B. Liu und C. Benning, „Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself“, *Curr. Opin. Biotechnol.*, Bd. 24, Nr. 2, S. 300–309, Apr. 2013.

- [190] J. L. Harwood und I. A. Guschina, „The versatility of algae and their lipid metabolism“, *Biochimie*, Bd. 91, Nr. 6, S. 679–684, Juni 2009.
- [191] Y. Li, D. Han, G. Hu, M. Sommerfeld, und Q. Hu, „Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*“, *Biotechnol. Bioeng.*, Bd. 107, Nr. 2, S. 258–268, Okt. 2010.
- [192] W.-L. Yu, W. Ansari, N. G. Schoepp, M. J. Hannon, S. P. Mayfield, und M. D. Burkart, „Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae“, *Microb. Cell Factories*, Bd. 10, S. 91, 2011.
- [193] H.-G. Gierloff-Emden, *Geographie des Meeres – Ozeane und Küsten*. Walter de Gruyter, 1990.
- [194] P. Hyka, S. Lickova, P. Přibyl, K. Melzoch, und K. Kovar, „Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae“, *Biotechnol. Adv.*, Bd. 31, Nr. 1, S. 2–16, Jan. 2013.
- [195] J. Rumin, H. Bonnefond, B. Saint-Jean, C. Rouxel, A. Sciandra, O. Bernard, J.-P. Cadoret, und G. Bougaran, „The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae“, *Biotechnol. Biofuels*, Bd. 8, S. 42, 2015.
- [196] „<http://flowcytometry.med.ualberta.ca/wp-content/uploads/2015/04/Flow-Cytometry-how-it-works-Diagram.jpg>“. 03-Mai-2016.
- [197] M. Li, L. Yang, Y. Bai, und H. Liu, „Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications“, *Anal. Chem.*, Bd. 86, Nr. 1, S. 161–175, Jan. 2014.
- [198] J. Picot, C. L. Guerin, C. Le Van Kim, und C. M. Boulanger, „Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation“, *Cytotechnology*, Bd. 64, Nr. 2, S. 109–130, März 2012.
- [199] M. F. Montero, M. Aristizábal, und G. G. Reina, „Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting“, *J. Appl. Phycol.*, Bd. 23, Nr. 6, S. 1053–1057, Nov. 2010.
- [200] Y. Han, Q. Wen, Z. Chen, und P. Li, „Review of Methods Used for Microalgal Lipid-Content Analysis“, *Energy Procedia*, Bd. 12, S. 944–950, 2011.
- [201] G. R. Castro, B. K. Larson, B. Panilaitis, und D. L. Kaplan, „Emulsan quantitation by Nile red quenching fluorescence assay“, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Bd. 67, Nr. 6, S. 767–770, Juni 2005.
- [202] A. A. Fernandez-Jaramillo, C. Duarte-Galvan, L. M. Contreras-Medina, I. Torres-Pacheco, R. de J. Romero-Troncoso, R. G. Guevara-Gonzalez, und J. R. Millan-Almaraz, „Instrumentation in Developing Chlorophyll Fluorescence Biosensing: A Review“, *Sensors*, Bd. 12, Nr. 9, S. 11853–11869, Aug. 2012.
- [203] T. Govender, L. Ramanna, I. Rawat, und F. Bux, „BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae“, *Bioresour. Technol.*, Bd. 114, S. 507–511, Juni 2012.
- [204] V. V. Roshchina und V. V. Roshchina, „Vital Autofluorescence: Application to the Study of Plant Living Cells, Vital Autofluorescence: Application to the Study of Plant Living Cells“, *Int. J. Spectrosc. Int. J. Spectrosc.*, Bd. 2012, 2012, S. e124672, Sep. 2012.

- [205] V. Melis, I. Usach, and J.-E. Peris, „Determination of sertraline in rat plasma by HPLC and fluorescence detection and its application to in vivo pharmacokinetic studies“, *J. Sep. Sci.*, Bd. 35, Nr. 23, S. 3302–3307, Dez. 2012.
- [206] A. Herms, M. Bosch, N. Ariotti, B. J. N. Reddy, A. Fajardo, A. Fernández-Vidal, A. Alvarez-Guaita, M. A. Fernández-Rojo, C. Rentero, F. Tebar, C. Enrich, M.-I. Geli, R. G. Parton, S. P. Gross, and A. Pol, „Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity“, *Curr. Biol. CB*, Bd. 23, Nr. 15, S. 1489–1496, Aug. 2013.
- [207] L. Provasoli, J. J. Mclaughlin, and M. R. Droop, „The development of artificial media for marine algae“, *Arch. Für Mikrobiol.*, Bd. 25, Nr. 4, S. 392–428, 1957.
- [208] J. A. Myers, B. S. Curtis, and W. R. Curtis, „Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density“, *BMC Biophys.*, Bd. 6, Nr. 1, S. 4, 2013.
- [209] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, „A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 226, Nr. 1, S. 497–509, Mai 1957.
- [210] D. Jäger, C. Pilger, H. Hachmeister, E. Oberlander, R. Wördenweber, J. Mussgnung, T. Huser, and O. Kruse, „Label-free in vivo analysis of intracellular lipid droplets in the oleaginous microalga *Monoraphidium neglectum* by coherent Raman scattering microscopy“, *Vorbereit.*
- [211] M. Lutz und J. Breton, „Chlorophyll associations in the chloroplast: resonance Raman spectroscopy“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 53, Nr. 2, S. 413–418, Juli 1973.
- [212] C. Matthäus, B. Bird, M. Miljković, T. Chernenko, M. Romeo, und M. Diem, „Chapter 10: Infrared and Raman microscopy in cell biology“, *Methods Cell Biol.*, Bd. 89, S. 275–308, 2008.
- [213] A. M. Collins, H. D. T. Jones, D. Han, Q. Hu, T. E. Beechem, und J. A. Timlin, „Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)“, *PloS One*, Bd. 6, Nr. 9, S. e24302, 2011.
- [214] O. Samek, A. Jonáš, Z. Pilát, P. Zemánek, L. Nedbal, J. Třiska, P. Kotas, und M. Trtílek, „Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo“, *Sensors*, Bd. 10, Nr. 9, S. 8635–8651, Sep. 2010.
- [215] S. K. Brahma, P. E. Hargraves, W. F. Howard, und W. H. Nelson, „A Resonance Raman Method for the Rapid Detection and Identification of Algae in Water“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 37, Nr. 1, S. 55–58, Jan. 1983.
- [216] Y. Kubo, T. Ikeda, S.-Y. Yang, und M. Tsuboi, „Orientation of Carotenoid Molecules in the Eyespot of Alga: *In Situ* Polarized Resonance Raman Spectroscopy“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 54, Nr. 8, S. 1114–1119, Aug. 2000.
- [217] P. P. Lamers, C. C. W. van de Laak, P. S. Kaasenbrood, J. Lorier, M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino, und R. H. Wijffels, „Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*“, *Biotechnol. Bioeng.*, Bd. 106, Nr. 4, S. 638–648, Juli 2010.
- [218] A. C. Guedes, H. M. Amaro, und F. X. Malcata, „Microalgae as Sources of Carotenoids“, *Mar. Drugs*, Bd. 9, Nr. 4, S. 625–644, Apr. 2011.

- [219] C. Castiglioni, M. Del Zoppo, und G. Zerbi, „Vibrational Raman spectroscopy of polyconjugated organic oligomers and polymers“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 24, Nr. 8, S. 485–494, Aug. 1993.
- [220] S. F. Parker, S. M. Tavender, N. M. Dixon, H. Herman, K. P. J. Williams, und W. F. Maddams, „Raman Spectrum of beta-Carotene Using Laser Lines from Green (514.5 nm) to Near-Infrared (1064 nm): Implications for the Characterization of Conjugated Polyenes“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 53, Nr. 1, S. 86–91, Jan. 1999.
- [221] T. Takenaka, N. Isono, J. Umemura, M. Shimomura, und T. Kunitake, „Polarized UV resonance Raman and absorption spectra of monolayers adsorbed at the aqueous solution-carbon tetrachloride interface“, *Chem. Phys. Lett.*, Bd. 128, Nr. 5, S. 551–554, Aug. 1986.
- [222] H. H. An, W. B. Han, Y. Kim, H.-S. Kim, Y. Oh, und C. S. Yoon, „Preparation of SERS active Ag nanoparticles encapsulated by phospholipids“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 292–298, Apr. 2014.
- [223] F. Vollmer und S. Arnold, „Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules“, *Nat. Methods*, Bd. 5, Nr. 7, S. 591–596, Juli 2008.
- [224] A. M. Armani, R. P. Kulkarni, S. E. Fraser, R. C. Flagan, und K. J. Vahala, „Label-Free, Single-Molecule Detection with Optical Microcavities“, *Science*, Bd. 317, Nr. 5839, S. 783–787, Aug. 2007.
- [225] F. Vollmer, D. Braun, A. Libchaber, M. Khoshsim, I. Teraoka, und S. Arnold, „Protein detection by optical shift of a resonant microcavity“, *Appl. Phys. Lett.*, Bd. 80, Nr. 21, S. 4057–4059, Mai 2002.
- [226] W. L. Kubasek, Y. Wang, G. A. Thomas, T. W. Patapoff, K. H. Schoenwaelder, J. H. Van der Sande, und W. L. Peticolas, „Raman spectra of the model B-DNA oligomer d(CGCGAATTCGCG)₂ and of the DNA in living salmon sperm show that both have very similar B-type conformations“, *Biochemistry (Mosc.)*, Bd. 25, Nr. 23, S. 7440–7445, Nov. 1986.
- [227] K. J. Vahala, „Optical microcavities“, *Nature*, Bd. 424, Nr. 6950, S. 839–846, Aug. 2003.
- [228] A. N. Oraevsky, „Whispering-gallery waves“, *Quantum Electron.*, Bd. 32, Nr. 5, S. 377–400, Mai 2002.
- [229] L. K. Ausman und G. C. Schatz, „Whispering-gallery mode resonators: Surface enhanced Raman scattering without plasmons“, *J. Chem. Phys.*, Bd. 129, Nr. 5, S. 54704, Aug. 2008.
- [230] S. Kim, W. Zhang, und B. T. Cunningham, „Coupling discrete metal nanoparticles to photonic crystal surface resonant modes and application to Raman spectroscopy“, *Opt. Express*, Bd. 18, Nr. 5, S. 4300, März 2010.
- [231] T. van Leest und J. Caro, „Cavity-enhanced optical trapping of bacteria using a silicon photonic crystal“, *Lab. Chip*, Bd. 13, Nr. 22, S. 4358, 2013.
- [232] A. Fainstein, B. Jusserand, und V. Thierry-Mieg, „Raman Scattering Enhancement by Optical Confinement in a Semiconductor Planar Microcavity“, *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 75, Nr. 20, S. 3764–3767, Nov. 1995.

- [233] F. Billard, D. Gachet, und H. Rigneault, „Coherent anti-Stokes Raman scattering in a Fabry-Perot cavity: A theoretical study“, *J. Opt. Soc. Am. B*, Bd. 26, Nr. 7, S. 1295, Juli 2009.
- [234] D. Chanda, K. Shigeta, T. Truong, E. Lui, A. Mihi, M. Schulmerich, P. V. Braun, R. Bhargava, und J. A. Rogers, „Coupling of plasmonic and optical cavity modes in quasi-three-dimensional plasmonic crystals“, *Nat. Commun.*, Bd. 2, S. 479, Sep. 2011.
- [235] A. M. Kern, D. Zhang, M. Brecht, A. I. Chizhik, A. V. Failla, F. Wackenhut, und A. J. Meixner, „Enhanced single-molecule spectroscopy in highly confined optical fields: from $\lambda/2$ -Fabry-Pérot resonators to plasmonic nano-antennas“, *Chem. Soc. Rev.*, Bd. 43, Nr. 4, S. 1263–1286, Feb. 2014.
- [236] J. C. Knight, G. Cheung, F. Jacques, und T. A. Birks, „Phase-matched excitation of whispering-gallery-mode resonances by a fiber taper“, *Opt. Lett.*, Bd. 22, Nr. 15, S. 1129, Aug. 1997.
- [237] M. Steiner, F. Schleifenbaum, C. Stupperich, A. V. Failla, A. Hartschuh, und A. J. Meixner, „A new microcavity design for single molecule detection“, *J. Lumin.*, Bd. 119–120, S. 167–172, Juli 2006.
- [238] M. Steiner, F. Schleifenbaum, C. Stupperich, A. Virgilio Failla, A. Hartschuh, und A. J. Meixner, „Microcavity-Controlled Single-Molecule Fluorescence“, *ChemPhysChem*, Bd. 6, Nr. 10, S. 2190–2196, Okt. 2005.
- [239] A. I. Chizhik, I. Gregor, B. Ernst, und J. Enderlein, „Nanocavity-based determination of absolute values of photoluminescence quantum yields“, *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, Bd. 14, Nr. 3, S. 505–513, Feb. 2013.
- [240] D. Khoptyar, R. Gutbrod, A. Chizhik, J. Enderlein, F. Schleifenbaum, M. Steiner, und A. J. Meixner, „Tight focusing of laser beams in a $\lambda/2$ -microcavity“, *Opt. Express*, Bd. 16, Nr. 13, S. 9907–9917, Juni 2008.
- [241] F. Vult von Steyern, J. O. Josefsson, und S. Tågerud, „Rhodamine B, a fluorescent probe for acidic organelles in denervated skeletal muscle“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, Bd. 44, Nr. 3, S. 267–274, März 1996.
- [242] Y. Gan, „Atomic and subnanometer resolution in ambient conditions by atomic force microscopy“, *Surf. Sci. Rep.*, Bd. 64, Nr. 3, S. 99–121, März 2009.
- [243] H.-D. Dörfler und W. Rettig, „Einfluß aliphatischer Kohlenwasserstoffe auf die Kompressionseigenschaften monomolekularer Fettsäurefilme“, *Colloid Polym. Sci.*, Bd. 260, Nr. 12, S. 1121–1125, Dez. 1982.
- [244] H.-G. Rubahn, *Nanophysik und Nanotechnologie*. Springer-Verlag, 2013.
- [245] G. G. Roberts, „An applied science perspective of Langmuir-Blodgett films“, *Adv. Phys.*, Bd. 34, Nr. 4, S. 475–512, Jan. 1985.
- [246] C. K. Yee, M. L. Amweg, und A. N. Parikh, „Membrane Photolithography: Direct Micropatterning and Manipulation of Fluid Phospholipid Membranes in the Aqueous Phase Using Deep-UV Light“, *Adv. Mater.*, Bd. 16, Nr. 14, S. 1184–1189, Juli 2004.
- [247] A. Turchanin, D. Weber, M. Büenfeld, C. Kisielowski, M. V. Fistul, K. B. Efetov, T. Weimann, R. Stosch, J. Mayer, und A. Götzhäuser, „Conversion of Self-

- Assembled Monolayers into Nanocrystalline Graphene: Structure and Electric Transport“, *ACS Nano*, Bd. 5, Nr. 5, S. 3896–3904, Mai 2011.
- [248] C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, und J. Hone, „Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene“, *Science*, Bd. 321, Nr. 5887, S. 385–388, Juli 2008.
- [249] D. G. Matei, N.-E. Weber, S. Kurasch, S. Wundrack, M. Woszczyzna, M. Grothe, T. Weimann, F. Ahlers, R. Stosch, U. Kaiser, und A. Turchanin, „Functional Single-Layer Graphene Sheets from Aromatic Monolayers“, *Adv. Mater.*, Bd. 25, Nr. 30, S. 4146–4151, Aug. 2013.
- [250] J. a. G. Briggs, J. D. Riches, B. Glass, V. Bartonova, G. Zanetti, und H.-G. Kräusslich, „Structure and assembly of immature HIV“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 106, Nr. 27, S. 11090–11095, Juli 2009.
- [251] W. I. Sundquist und H.-G. Kräusslich, „HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation“, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, Bd. 2, Nr. 7, Juli 2012.
- [252] M. Moskovits, „Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective“, *J. Raman Spectrosc.*, Bd. 36, Nr. 6–7, S. 485–496, Juni 2005.
- [253] C. E. Talley, J. B. Jackson, C. Oubre, N. K. Grady, C. W. Hollars, S. M. Lane, T. R. Huser, P. Nordlander, und N. J. Halas, „Surface-enhanced Raman scattering from individual Au nanoparticles and nanoparticle dimer substrates“, *Nano Lett.*, Bd. 5, Nr. 8, S. 1569–1574, Aug. 2005.
- [254] P. G. Etchegoin und E. C. Le Ru, „A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges“, *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP*, Bd. 10, Nr. 40, S. 6079–6089, Okt. 2008.
- [255] E. C. L. Ru und P. G. Etchegoin, „Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy“, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, Bd. 63, Nr. 1, S. 65–87, 2012.
- [256] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, und M. A. El-Sayed, „Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy“, *Nanomed.*, Bd. 2, Nr. 5, S. 681–693, Okt. 2007.
- [257] E. C. L. Ru und P. G. Etchegoin, „Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy“, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, Bd. 63, Nr. 1, S. 65–87, 2012.
- [258] T. K. Sau und A. L. Rogach, *Complex-shaped Metal Nanoparticles: Bottom-Up Syntheses and Applications*. John Wiley & Sons, 2012.
- [259] D. Radziuk und H. Moehwald, „Prospects for plasmonic hot spots in single molecule SERS towards the chemical imaging of live cells“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Bd. 17, Nr. 33, S. 21072–21093, Aug. 2015.
- [260] A. Pallaoro, M. R. Hoonejani, G. B. Braun, C. D. Meinhart, und M. Moskovits, „Rapid Identification by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Cancer Cells at Low Concentrations Flowing in a Microfluidic Channel“, *ACS Nano*, Bd. 9, Nr. 4, S. 4328–4336, Apr. 2015.
- [261] P. Nordlander, C. Oubre, E. Prodan, K. Li, und M. I. Stockman, „Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers“, *Nano Lett.*, Bd. 4, Nr. 5, S. 899–903, Mai 2004.

- [262] K. L. Wustholz, A.-I. Henry, J. M. McMahon, R. G. Freeman, N. Valley, M. E. Piotti, M. J. Natan, G. C. Schatz, und R. P. V. Duyne, „Structure–Activity Relationships in Gold Nanoparticle Dimers and Trimers for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 132, Nr. 31, S. 10903–10910, Aug. 2010.
- [263] M. Moskovits, „Persistent misconceptions regarding SERS“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Bd. 15, Nr. 15, S. 5301–5311, März 2013.
- [264] J. Kneipp, H. Kneipp, und K. Kneipp, „SERS--a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics“, *Chem. Soc. Rev.*, Bd. 37, Nr. 5, S. 1052–1060, Mai 2008.
- [265] M. Fleischmann, P. J. Hendra, und A. J. McQuillan, „Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode“, *Chem. Phys. Lett.*, Bd. 26, Nr. 2, S. 163–166, Mai 1974.
- [266] M. G. Albrecht und J. A. Creighton, „Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 99, Nr. 15, S. 5215–5217, Juni 1977.
- [267] D. L. Jeanmaire und R. P. Van Duyne, „Surface raman spectroelectrochemistry“, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, Bd. 84, Nr. 1, S. 1–20, Nov. 1977.
- [268] R. F. Peters, L. Gutierrez-Rivera, S. K. Dew, und M. Stepanova, „Surface Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Biomolecules Using EBL Fabricated Nanostructured Substrates“, *J. Vis. Exp. JoVE*, Nr. 97, März 2015.
- [269] D. Cialla, S. Pollok, C. Steinbrücker, K. Weber, und J. Popp, „SERS-based detection of biomolecules“, *Nanophotonics*, Bd. 3, Nr. 6, S. 383–411, 2013.
- [270] B. D. Piorek, S. J. Lee, M. Moskovits, und C. D. Meinhart, „Free-Surface Microfluidics/Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Real-Time Trace Vapor Detection of Explosives“, *Anal. Chem.*, Bd. 84, Nr. 22, S. 9700–9705, Nov. 2012.
- [271] R. Lal, S. Ramachandran, und M. F. Arnsdorf, „Multidimensional Atomic Force Microscopy: A Versatile Novel Technology for Nanopharmacology Research“, *AAPS J.*, Bd. 12, Nr. 4, S. 716–728, Okt. 2010.
- [272] K. Ambal, P. Rahe, A. Payne, J. Slinkman, C. C. Williams, und C. Boehme, „Electrical current through individual pairs of phosphorus donor atoms and silicon dangling bonds“, *Sci. Rep.*, Bd. 6, S. 18531, Jan. 2016.
- [273] Y. Okuno, Y. Saito, S. Kawata, und P. Verma, „Tip-enhanced Raman investigation of extremely localized semiconductor-to-metal transition of a carbon nanotube“, *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 111, Nr. 21, S. 216101, Nov. 2013.
- [274] S. Najjar, D. Talaga, L. Schué, Y. Coffinier, S. Szunerits, R. Boukherroub, L. Servant, V. Rodriguez, und S. Bonhommeau, „Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Combed Double-Stranded DNA Bundles“, *J. Phys. Chem. C*, Bd. 118, Nr. 2, S. 1174–1181, Jan. 2014.
- [275] R. S. Das und Y. K. Agrawal, „Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications“, *Vib. Spectrosc.*, Bd. 57, Nr. 2, S. 163–176, Nov. 2011.
- [276] D. Pletcher, Z.-Q. Tian, und D. Williams, *Developments in Electrochemistry: Science Inspired by Martin Fleischmann*. John Wiley & Sons, 2014.

- [277] E. J. R. Vesseur, J. Aizpurua, T. Coenen, A. Reyes-Coronado, P. E. Batson, and A. Polman, „Plasmonic excitation and manipulation with an electron beam“, *MRS Bull.*, Bd. 37, Nr. 8, S. 752–760, Aug. 2012.
- [278] T. Coenen und A. Polman, „Optical Properties of Single Plasmonic Holes Probed with Local Electron Beam Excitation“, *ACS Nano*, Bd. 8, Nr. 7, S. 7350–7358, Juli 2014.
- [279] K. Bender, *Entwicklung und Charakterisierung verschiedener biomimetischer Lipidmembransysteme zur Untersuchung von Membranproteinen*. Cuvillier Verlag, 2005.
- [280] K. A. Willets und R. P. Van Duyne, „Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing“, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, Bd. 58, S. 267–297, 2007.
- [281] *Handbook of Nanoscale Optics and Electronics*. Academic Press, 2010.
- [282] R. F. Aroca, „Plasmon enhanced spectroscopy“, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Bd. 15, Nr. 15, S. 5355–5363, März 2013.
- [283] E. C. Le Ru und P. G. Etchegoin, „Rigorous justification of the $|E|^4$ enhancement factor in Surface Enhanced Raman Spectroscopy“, *Chem. Phys. Lett.*, Bd. 423, Nr. 1–3, S. 63–66, Mai 2006.
- [284] K. Höflich, M. Becker, G. Leuchs, und S. Christiansen, „Plasmonic dimer antennas for surface enhanced Raman scattering“, *Nanotechnology*, Bd. 23, Nr. 18, S. 185303, Mai 2012.
- [285] K. J. Savage, M. M. Hawkeye, R. Esteban, A. G. Borisov, J. Aizpurua, und J. J. Baumberg, „Revealing the quantum regime in tunnelling plasmonics“, *Nature*, Bd. 491, Nr. 7425, S. 574–577, Nov. 2012.
- [286] R. Esteban, A. G. Borisov, P. Nordlander, und J. Aizpurua, „Bridging quantum and classical plasmonics with a quantum-corrected model“, *Nat. Commun.*, Bd. 3, S. 825, Mai 2012.
- [287] W. Zhu und K. B. Crozier, „Quantum mechanical limit to plasmonic enhancement as observed by surface-enhanced Raman scattering“, *Nat. Commun.*, Bd. 5, S. 5228, Okt. 2014.
- [288] L. Mao, Z. Li, B. Wu, und H. Xu, „Effects of quantum tunneling in metal nanogap on surface-enhanced Raman scattering“, *Appl. Phys. Lett.*, Bd. 94, Nr. 24, S. 243102, Juni 2009.
- [289] D. C. Marinica, A. K. Kazansky, P. Nordlander, J. Aizpurua, und A. G. Borisov, „Quantum Plasmonics: Nonlinear Effects in the Field Enhancement of a Plasmonic Nanoparticle Dimer“, *Nano Lett.*, Bd. 12, Nr. 3, S. 1333–1339, März 2012.
- [290] J. A. Guicheteau, M. E. Farrell, S. D. Christesen, A. W. Fountain, P. M. Pellegrino, E. D. Emmons, A. Tripathi, P. Wilcox, und D. Emge, „Surface-enhanced Raman scattering (SERS) evaluation protocol for nanometallic surfaces“, *Appl. Spectrosc.*, Bd. 67, Nr. 4, S. 396–403, Apr. 2013.
- [291] R. Chang, *Surface Enhanced Raman Scattering*. Springer Science & Business Media, 2013.

- [292] K. Manzel, W. Schulze, und M. Moskvits, „Surface-enhanced raman spectra of C₂H₂ and C₂H₄ adsorbed on silver colloid“, *Chem. Phys. Lett.*, Bd. 85, Nr. 2, S. 183–186, Jan. 1982.
- [293] X. Qian, S. R. Emory, und S. Nie, „Anchoring Molecular Chromophores to Colloidal Gold Nanocrystals: Surface-Enhanced Raman Evidence for Strong Electronic Coupling and Irreversible Structural Locking“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 134, Nr. 4, S. 2000–2003, Feb. 2012.
- [294] Y. Ozaki, K. Kneipp, und R. Aroca, *Frontiers of Surface-Enhanced Raman Scattering: Single Nanoparticles and Single Cells*. John Wiley & Sons, 2014.
- [295] N. D. Israelsen, C. Hanson, E. Vargis, N. D. Israelsen, C. Hanson, und E. Vargis, „Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction, Nanoparticle Properties and Synthesis Effects on Surface-Enhanced Raman Scattering Enhancement Factor: An Introduction“, *Sci. World J. Sci. World J.*, Bd. 2015, 2015, S. e124582, März 2015.
- [296] I. Heesemann, „Dissertation“.
- [297] S. D. Perrault und W. C. W. Chan, „Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 131, Nr. 47, S. 17042–17043, Dez. 2009.
- [298] G. Seifert, „G. Schmid (ed.). Clusters and colloids. From Theory to Applications. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1994, 546 p., 232 figs., 37 tabs., hard cover, ISBN 3-527-29043-5“, *Cryst. Res. Technol.*, Bd. 29, Nr. 7, S. 956–956, Jan. 1994.
- [299] V. Kumar, *Nanosilicon*. Elsevier, 2011.
- [300] Matthias Hensen, I. Heesemann, E. Oberlander, T. Huser, A. Godt, und W. Pfeiffer, „Nanoparticle Dimer-Induced Raman Enhancement in Au-Nanoparticle Aggregates Formed with Rod-like Alkyne-rich Dithiol as Linker and Raman Reporter“, *Vorbereit.*
- [301] J. M. Tour, L. Jones, D. L. Pearson, J. J. S. Lamba, T. P. Burgin, G. M. Whitesides, D. L. Allara, A. N. Parikh, und S. Atre, „Self-Assembled Monolayers and Multilayers of Conjugated Thiols, α,ω -Dithiols, and Thioacetyl-Containing Adsorbates. Understanding Attachments between Potential Molecular Wires and Gold Surfaces“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 117, Nr. 37, S. 9529–9534, Sep. 1995.
- [302] J. M. McMahon, A.-I. Henry, K. L. Wustholz, M. J. Natan, R. G. Freeman, R. P. Van Duyne, und G. C. Schatz, „Gold nanoparticle dimer plasmonics: finite element method calculations of the electromagnetic enhancement to surface-enhanced Raman spectroscopy“, *Anal. Bioanal. Chem.*, Bd. 394, Nr. 7, S. 1819–1825, Aug. 2009.
- [303] H. Yamakoshi, K. Dodo, A. Palonpon, J. Ando, K. Fujita, S. Kawata, und M. Sodeoka, „Alkyne-Tag Raman Imaging for Visualization of Mobile Small Molecules in Live Cells“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 134, Nr. 51, S. 20681–20689, Dez. 2012.
- [304] J. M. Dudik, C. R. Johnson, und S. A. Asher, „UV resonance Raman studies of acetone, acetamide, and N-methylacetamide: models for the peptide bond“, *J. Phys. Chem.*, Bd. 89, Nr. 18, S. 3805–3814, Aug. 1985.

- [305] E. Giorgetti, M. Muniz-Miranda, P. Marsili, D. Scarpellini, und F. Giammanco, „Stable gold nanoparticles obtained in pure acetone by laser ablation with different wavelengths“, *J. Nanoparticle Res.*, Bd. 14, Nr. 1, S. 1–13, Jan. 2012.
- [306] C. E. Talley, J. B. Jackson, C. Oubre, N. K. Grady, C. W. Hollars, S. M. Lane, T. R. Huser, P. Nordlander, und N. J. Halas, „Surface-Enhanced Raman Scattering from Individual Au Nanoparticles and Nanoparticle Dimer Substrates“, *Nano Lett.*, Bd. 5, Nr. 8, S. 1569–1574, Aug. 2005.
- [307] E. Hao und G. C. Schatz, „Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers“, *J. Chem. Phys.*, Bd. 120, Nr. 1, S. 357–366, Jan. 2004.
- [308] G. Mie, „Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen“, *Ann. Phys.*, Bd. 330, Nr. 3, S. 377–445, Jan. 1908.
- [309] A. Taflove, A. Oskooi, und S. G. Johnson, *Advances in FDTD Computational Electrodynamics: Photonics and Nanotechnology*. Artech House, 2013.
- [310] M. Hensen, „Dissertation“.
- [311] R. W. Taylor, R. Esteban, S. Mahajan, J. Aizpurua, und J. J. Baumberg, „Optimizing SERS from Gold Nanoparticle Clusters: Addressing the Near Field by an Embedded Chain Plasmon Model“, *J. Phys. Chem. C*, Bd. 120, Nr. 19, S. 10512–10522, Mai 2016.
- [312] P. G. Etchegoin, E. C. L. Ru, und M. Meyer, „An analytic model for the optical properties of gold“, *J. Chem. Phys.*, Bd. 125, Nr. 16, S. 164705, Okt. 2006.
- [313] S. L. Kleinman, B. Sharma, M. G. Blaber, A.-I. Henry, N. Valley, R. G. Freeman, M. J. Natan, G. C. Schatz, und R. P. Van Duyne, „Structure enhancement factor relationships in single gold nanoantennas by surface-enhanced Raman excitation spectroscopy“, *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 135, Nr. 1, S. 301–308, Jan. 2013.
- [314] H. Song, M. A. Reed, und T. Lee, „Single molecule electronic devices“, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, Bd. 23, Nr. 14, S. 1583–1608, Apr. 2011.
- [315] F. Moresco und A. Gourdon, „Scanning tunneling microscopy experiments on single molecular landers“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 102, Nr. 25, S. 8809–8814, Juni 2005.